

Descripción

Composición de biopesticida con efecto sinérgico y método para combatir y controlar plagas

5 Campo de la invención

La presente invención hace referencia a una composición sinérgica para uso como biopesticida, concretamente un acaricida adaptado para su uso en agricultura orgánica y/o tradicional. El efecto sinérgico de los principios activos permite un control apropiado a tasas de aplicación reducidas para cada componente. La presente invención hace referencia a un método para controlar y combatir plagas en el sector agrícola.

Antecedentes de la invención

Entendemos por plaga cualquier especie, cepa o biotipo de planta, animal o agente patógeno perjudicial para las plantas o productos vegetales, o dañino para los seres humanos. El término se utiliza especialmente en referencia a criaturas que dañan los cultivos, el ganado y los bosques, o provocan molestias a las personas, principalmente en sus hogares. Los cultivos agrícolas y hortícolas son víctimas de ataques por parte de una amplia variedad de plagas, en especial insectos, ácaros, nematodos y moluscos gasterópodos. Los daños que provocan incluyen tanto el daño directo que causan a las plantas como las consecuencias indirectas de las infecciones fúngicas, bacterianas o virales que transmiten.

Tetranychus urticae Koch (Acari:Tetranychidae) también conocido como araña roja o ácaro rojo de dos manchas (TSSM, por sus siglas en inglés) está incluido en el Compendio de Especies Invasoras (ISC) de CABI (<https://www.cabi.org/isc/datasheet/53366>). El TSSM es una de las plagas de frutas, verduras y plantas ornamentales de mayor repercusión económica en todo el mundo. Consta que ataca a más de 1200 especies de plantas y es la más polífaga de la familia Tetranychidae. Según la base de datos de resistencia a los artrópodos, se han comunicado más de 500 casos de resistencia (un 90 %) a los acaricidas para esta especie (<https://www.pesticideresistance.org/search.php>). Puede alimentarse de la mayoría de vegetales y cultivos alimenticios, por ejemplo: pimientos, tomates, patatas, pepinos, judías, maíz, fresas o plantas ornamentales como las rosas. Pone los huevos en las hojas, lo que provoca un efecto directo en las plantas hospedantes, por ejemplo,

pequeñas manchas pálidas o cicatrices en las hojas debido a la pérdida de clorofila, defoliación o necrosis en hojas jóvenes. Aunque las lesiones individuales son muy pequeñas, el ataque de cientos o miles de ácaros puede provocar miles de lesiones. Esto, a su vez, puede reducir significativamente la capacidad fotosintética y de transpiración de las plantas, e incluso, la muerte.

El impacto económico del ácaro *Tetranychus urticae* en cultivos hortícolas de alto valor es inmenso ya que provoca daños directos (al alimentarse de la fruta) y un defecto cosmético. El ácaro rojo de dos manchas es una importante plaga para los tomates (*Solanum lycopersicon* L.) en el centro y el oeste de Carolina del Norte (Meck et al., 2009), para las fresas (*Fragaria x ananassa* Duchesne) (Wyman et al., 1979; Walsh et al., 1998), los pepinos cultivados en invernadero (*Cucumis sativus* L.) (Park y Lee, 2005) y la soja (*Glycine max* L. Merr.) (G. Padilha et al. 2020). Así, el ácaro rojo es una plaga importante y existen tratamientos para combatirlo: aerosoles orgánicos como el piretro natural (por ejemplo, Bug Clear Gun para frutas y verduras o BugFree Bug and Larvae Killer de Neudorff), ácidos grasos (por ejemplo, Bug Free de Solabiol o Doff Greenfly & Blackfly Killer) o aceites vegetales (por ejemplo, Vitax Plant Guard Pest & Disease Control o Bug Clear para frutas y verduras). Estos tratamientos, si bien pueden aportar cierto control sobre el ácaro rojo, este ácaro ha desarrollado resistencia al ingrediente activo de algunos de ellos.

Estos pesticidas tienen una continuación muy corta y puede que resulte necesario volver a aplicarlos para mantener bajo control la cantidad de ácaros rojos. Los productos a base de aceites vegetales y ácidos grasos es menos probable que afecten a insectos más grandes, como las mariquitas adultas, tal y como se comercializan actualmente.

Por un lado, la actividad biológica del aceite de eucalipto, con propiedades acaricidas de aceite de *Eucalyptus* sp. (incluidos *E. globulus*) se atribuyen a los principales compuestos detectados en el aceite: Eucaliptol (1,8 cineol) y Limoneno (Badawy et al., 2010; Camilo et al., 2017; Abdelgaleil et al., 2019; Aissaoui et al., 2019; Saroj et al., 2020). EP 0869714 proporciona un método para controlar infestaciones de ácaros, lepidópteros, hongos y bacterias en colonias de abejas melíferas, el cual consiste en la aplicación de una cantidad eficaz de un aceite esencial, en el que se reivindica el aceite de eucalipto como compuesto. Además, un método para el control de infestaciones de

ácaros, lepidópteros, hongos y bacterias de colonias de abejas, y composiciones de control de infestaciones adecuadas para tal efecto.

Y por otro lado, también se conoce el efecto biopesticida de los terpenos (Badawy et al. 2010) la actividad acaricida de 12 monoterpenos contra el ácaro rojo de dos manchas, *Tetranychus urticae* Koch. Cada terpeno se prueba individualmente mediante fumigación y aplicación por contacto directo. (Lamy, et al. 2016).

El uso de compuestos orgánicos volátiles (COV) derivados de plantas para manipular el comportamiento de plagas de insectos se puede aplicar utilizando una estrategia de manejo integrado de plagas (MIP) mediante una combinación de estímulos atractivos y repulsivos. El efecto de cinco COV sintéticos (disulfuro de dimetilo, linalol, geraniol, eucaliptol y citronelol) sobre la oviposición de la mosca del repollo *Delia radicum*.

Sin embargo, aquí no hay indicios de efectos sinérgicos en la salud de las plantas. El efecto sinérgico entre el aceite esencial y un monoterpeno, utilizado como biopesticida para combatir la *Tetranychus urticae* y otras plagas, no está divulgado.

Resumen de la invención

La presente invención ofrece una composición biopesticida para combatir y controlar plagas en cultivos. Aquí se describe el efecto sinérgico de la composición biopesticida para liberar una cantidad efectiva de aceite esencial y un componente monoterpénico. Además, la composición biopesticida incluye componentes inertes y/o coformulantes seleccionados de un grupo que consta de emulsionantes, esparcidores, penetrantes, humectantes, surfactantes no iónicos a base de silicona y agua.

Se han descrito varios métodos de extracción para la obtención de extractos bioactivos, aceites esenciales y/o sus respectivas fracciones. Pueden clasificarse en métodos convencionales (maceración, infusión, percolación, decocción, extracción por reflujo, extracción Soxhlet, extracción líquido-líquido, extracción sólido-líquido, extracción por solvente, hidrodestilación, destilación al vapor) y métodos avanzados (extracción asistida por ultrasonido, extracción asistida por enzimas, extracción asistida por microondas, extracción asistida por campo eléctrico pulsado, extracción con fluidos supercríticos, extracción con líquido presurizado y sistemas basados en molinos

coloidales) (Adaramola y Onigbinde, 2017; Zhang et al., 2018). La extracción con disolventes (para la mayoría de extractos vegetales) y la destilación (específica para una amplia gama de aceites esenciales) son los métodos más utilizados y aceptados en las farmacopeas para la obtención de productos naturales. Los disolventes más habitualmente utilizados para la extracción de componentes activos son: agua, isopropanol, etanol y también se utilizan mezclas de etanol (mezclas hidroalcohólicas), metanol, cloroformo, hexano, éter y acetona, dependiendo de las materias primas y los compuestos que se quieran obtener.

En alguna realización, se puede utilizar cualquiera de los métodos mencionados para extraer el aceite esencial seleccionado de un grupo compuesto por las especies *Aframomum corrorima*, *Alpinia zerumbet*, *Alpinia officinarum*, *Alpinia zerumbet*, *Alpinia galanga*, *Artemisia tridentata*, *Artemisia vulgaris*, *Artemisia annua*, *Artemisia californica*, *Artemisia maritima*, *Baeckea frutescens*, *Callistemon viminalis*, *Cannabis sativa*, *Cannabis indica*, *Cannabis ruderalis*, *Cinnamomum camphora*, *Curcuma amada*, *Curcuma aromatica*, *Curcuma longa*, *Elettaria cardamomum*, *Eucalyptus cneorifolia*, *Eucalyptus dives*, *Eucalyptus dumosa*, *Eucalyptus flocktoniae*, *Eucalyptus globulus*, *Eucalyptus goniocalyx*, *Eucalyptus horistes*, *Eucalyptus kochii*, *Eucalyptus leucoxydon*, *Eucalyptus largiflorens*, *Eucalyptus mitchelliana*, *Eucalyptus oleosa*, *Eucalyptus oblonga*, *Eucalyptus polybractea*, *Eucalyptus radiata*, *Eucalyptus rossii*, *Eucalyptus sideroxylon*, *Eucalyptus smithii*, *Eucalyptus staigeriana*, *Eucalyptus spathulata*, *Eucalyptus tereticornis*, *Eucalyptus viridis*, *Hedychium coronarium*, *Helichrysum gymnocephalum*, *Hyptis suaveolens*, *Kaempferia galanga*, *Laurus nobilis*, *Melaleuca alternifolia*, *Melaleuca armillaris*, *Melaleuca alternifolia*, *Melaleuca leucandendra*, *Mentha arvensis*, *Mentha pulegium*, *Myrtus communis*, *Ocimum basilicum*, *Ravensara aromatica*, *Rosmarinus officinalis*, *Salvia lavandulifolia*, *Salvia officinalis*, *Satureja montana*, *Thryptomene saxicola*, *Turnera diffusa*, *Umbellularia californica* y *Zingiber officinale*.

En alguna realización de la presente invención, el componente de terpeno se selecciona de un grupo compuesto por anetol, b-ionona, borneol, alcanfor, careno, caroteno, carvacrol, acetato de carvacrol, carveol, carvona, cariofileno, óxido de cariofileno, quisantenol, cinamaldehído, cis-verbenol, citronelol, citronelal, citral, ácido cinámico, alcohol cinámico, dihidrocarveol, eugenol, farnesol, geraniol, geranial, linalol, acetato de linalilo, mentol, cinamato de metilo, mirceno, mirtenol, nerol, neral, nerolidol, alcohol

de pachulí, alcohol perílico, fitol, pineno, pulegona, escualeno, terpineol, timol, acetato de timol, timoquinona y tocotrienol.

En otra realización, el componente terpénico es preferiblemente geraniol, obtenido utilizando uno de los siguientes métodos:

- 5 (1) Hidrogenación selectiva de citral (síntesis de precursores naturales)
- (2) Destilación de geraniol crudo (de origen biológico)
- (3) De base natural (aislamiento y purificación de citronela) en un proceso
 compuesto por dos pasos:
- a. Destilación de hojas de citronela
- 10 b. Destilación fraccionada de aceite de citronela
- (4) De cualquier microorganismo que produzca geraniol mediante un proceso de
 fermentación.

En otra realización, el componente terpénico es preferiblemente carvacrol, obtenido utilizando uno de los siguientes métodos:

- 15 (1) Síntesis química como la fusión de ácido cimol sulfónico con potasa cáustica,
 o la acción del ácido nitroso sobre 1-metil-2-amino-4-propilbenceno, el
 calentamiento de alcanfor y yodo o carvol con ácido fosfórico glacial, la
 deshidrogenación de carvona con un catalizador de paladio sobre carbono o
 por transalquilación de cresoles isopropilados.
- 20 (2) Extraído de aceite esencial seleccionado del siguiente grupo de especies;
 Citrus aurantium bergamia, *Lavandula multifida*, *Lavandula pubescens*, *Lepidium*
 flavum, *Lippia graveolens*, *Monarda didyma*, *Nigella sativa*, *Origanum*
 compactum, *Origanum dictamnus*, *Origanum microphyllum*, *Origanum*
 minutiflorum *Origanum onites*, *Origanum scabrum*, *Origanum syriacum*,
25 *Origanum vulgare*, *Plectranthus amboinicus*, *Thymus glandulosus*, *Thymus*
 vulgaris, *Thymus capipatus*, *Thymus zygis*, *Thymus serpyllum* y *Zataria*
 multiflora.

En una realización preferida, la composición biopesticida consta de:

- 30 • Aceite esencial de *Eucalyptus globulus*,
 • Geraniol y

- Componentes inertes seleccionados de un grupo de emulsionantes, esparcidores, penetrantes, humectantes, surfactantes no iónicos a base de silicona y agua.

En otra realización preferida, la composición biopesticida consta de:

- 5
 - Aceite de *Ocimum basilicum*,
 - Carvacrol y
 - Componentes inertes seleccionados de un grupo de emulsionantes, esparcidores, penetrantes, humectantes, surfactantes no iónicos a base de silicona y agua.

10

El emulsionante es uno, o más, seleccionado entre derivados acrílicos como metacrilatos (entre otros), albúmina, éter de polioxietileno de alquilfenol, alcohol bencílico, copolímeros de acetato de vinilo, éster de ácido graso de polioxietileno, glicerol, glicoles, éter de polioxietileno de alcohol graso, lecitinas, manitol, estearato de

- 15 monoglicérido, copolímero de bloque de óxido de polialquileno, polietileno, éster de ácido graso de poliglicerina, ésteres de sorbitán polioxietilenados, éter de polioxietileno, alcoholes polivinílicos, polivinilpirrolidona, carboximetilcelulosa sódica, éster de sorbitán, ácido graso de sorbitán, sorbitol, estirilfenol y éster de sacarosa.

20

El surfactante no iónico a base de silicona es uno, o más, seleccionado entre: polidimetilsiloxanos modificados, organosiliconas, heptametil trisiloxanos modificados con polialquileno, dimetilpolisiloxanos modificados con óxido de polialquileno, heptametil trisiloxanos modificados con óxido de polialquileno, copolímeros de bloque de polioxipropileno-polioxietileno, copolímeros de poliéter-polimetilsiloxano,

- 25 dimetilsiloxanos polietoxilados, copolímeros de polimetilsiloxano, copolímeros de bloque de polioxipropileno-polioxietileno y copolímeros de silicona-poliéter.

30

Algunas realizaciones de la composición son en forma de polvo, gránulo, pastilla, gel, suspensión acuosa, solución o emulsión. La composición se aplica en cualquier etapa del ciclo de vida de la planta (semilla, germinación, plántulas, desarrollo vegetativo, desarrollo reproductivo, polinización y dispersión de semillas).

35

En algunas realizaciones de la invención, la composición se utiliza para combatir y controlar plagas, y para tratar enfermedades en cultivos. Estas plagas son provocadas por artrópodos.

Algunas realizaciones de la invención sirven para combatir y controlar plagas causadas por ácaridos como: *Abacarus* sp., *Aberoptus* sp., *Acalitus* sp., *Acanthonychus* sp., *Acaphylla* sp., *Acaphyllisa* sp., *Acaralox* sp., *Acarelliptus* sp., *Acaricalus* sp., *Aceria* sp.,
 5 *Achaetocoptes* sp., *Acritonotus* sp., *Aculochetus* sp., *Aculodes* sp., *Aculops* sp., *Aculus* sp., *Adenoptus* sp., *Aequosomatus* sp., *Afronobia* sp., *Allonychus* sp., *Amphitetranynchus* sp., *Anatetranynchus*, *Anthocoptes* sp. *Aplonobia* sp., *Aponychus* sp., *Atetranynchus* sp., *Atrichoproctus* sp., *Bariella* sp., *Beerella* sp., *Boczekiana* sp., *Brachendus* sp., *Brevinychus* sp., *Brevipalpus* sp., *Bryobia* sp., *Bryobiella* sp., *Bryocopsis* sp., *Calacarus*
 10 sp., *Calepitrimerus* sp., *Callyntrotus* sp., *Cecidophyes* sp., *Cecidophyopsis* sp., *Cisaberiptus* sp., *Colomerus* sp., *Coptophylla* sp., *Cosetacus* sp., *Criotacus* sp., *Crotonella* sp., *Cupacarus* sp., *Cymoptus* sp., *Dasyobia* sp., *Dichopelmus* sp., *Ditrymacus* sp., *Dolichonobia* sp., *Duplanychus* sp., *Edella* sp., *Eonychus* sp., *Eotetranynchus* sp., *Epitrimerus* sp., *Eremobryobia* sp., *Eriophyes* sp.,
 15 *Eurytetranychoides* sp., *Eurytetranynchus* sp., *Eutetranynchus* sp., *Evertella* sp., *Gilarovella* sp., *Glyptacus* sp., *Hellenynchus* sp., *Hemibryobia* sp., *Hystrichonychus* sp., *Keiferella* sp., *Leipothrix* sp., *Lindquistiella* sp., *Liroella* sp., *Magdalena* sp., *Marainobia* sp., *Mesalox* sp., *Mesobryobia* sp., *Metaculus* sp., *Meyernychus* sp., *Mezranobia* sp., *Mixonychus* sp., *Monoceronychus* sp., *Monochetus* sp., *Mononychellus* sp., *Neooxycenus* sp.,
 20 *Neoschizonobiella* sp., *Neotegonotus* sp., *Neotetranynchus* sp., *Neotrichobia* sp., *Notonychus* sp., *Oligonychus* sp., *Oxycenus* sp., *Palmanyachus* sp., *Panonychus* sp., *Parapetrobia* sp., *Paraphytoptus* sp., *Paraplombia* sp., *Paraponychus* sp., *Peltanobia* sp., *Petrobia* sp., *Phyllocoptes* sp., *Phyllocoptruta* sp., *Platyphytoptus* sp., *Platytetranynchus* sp., *Porcupinychus* sp., *Pseudobryobia* sp., *Reckella* sp., *Schizonobia*
 25 sp., *Schizonobiella* sp., *Schizotetranynchus* sp., *Shevtchenkella* sp., *Sinobryobia* sp., *Sinotetranynchus* sp., *Sonotetranynchus* sp., *Stenacis* sp., *Strunkobia* sp., *Synonychus* sp., *Tauriobia* sp., *Tegolophus* sp., *Tegonotus* sp., *Tegoprionus* sp., *Tenuipalpoides* sp., *Tenuipalponychus* sp., *Tetra* sp., *Tetranynchopsis* sp., *Tetranynchus* sp., *Tetraspinus* sp., *Thamnacus* sp., *Toronobia* sp., *Tumescopites* sp., *Vasates* sp., *Xinella* sp., *Yezonychus*
 30 sp. y *Yunonychus* sp.

Las realizaciones ejemplares de la presente invención demuestran la eficacia contra: *Tetranynchus urticae*, *Panonychys citri*, *Brevipalpus chilensis* y *Oligonychus yothersi*.

En otra realización de la invención, la composición sirve para combatir y controlar plagas en todo el ciclo de vida de los animales, huevos, ninfas y adultos.

5 Algunas realizaciones de la invención proporcionan un método para combatir y controlar plagas, aplicando una composición biopesticida para cualquiera de los usos descritos, directamente sobre las plagas o sobre cualquier tipo de superficie donde las ninfas y adultos de cualquier estadio de la plaga puedan entrar en contacto mediante goteo, pulverización y vaporización, o exponerse a la composición biopesticida provocando efectos comportamentales (antialimentarios y/o repelentes) sobre las plagas (adultos
10 y/o inmaduros).

El efecto sinérgico que proporciona la presente invención es favorable con respecto al estado de la técnica. La cantidad utilizada por cada compuesto es menor para un tratamiento de la que habría utilizado cada componente por separado. El efecto del
15 biopesticida (contacto, repelente, antialimentario) se mejora al mezclar ambos compuestos en las condiciones descritas. Además, la formulación final consigue un mecanismo de acción combinatorio y mejorado de los ingredientes individuales con un riesgo mínimo de aparición de resistencia de las plagas. Por la naturaleza de los ingredientes activos y los estudios complementarios disponibles, existe un riesgo
20 mínimo de bioacumulación y efectos negativos para la salud de las personas y los animales, y para la estabilidad de los ecosistemas.

Breve descripción de los dibujos

25 La presente invención se describirá a continuación de forma más detallada con estos ejemplos y figuras de referencia y no limitativos:

Figura 1. Diagrama del reactor de la formulación

Figura 2. Configuración experimental para bioensayo de aplicación tópica

Figura 3. Configuración experimental para bioensayo antialimentario *in vitro*

30 **Figura 4. Vista de una caja de cría Bugdorm®**

Figura 5. Dos plantas en una misma maceta, una tratada y otra sin tratar.

Figura 6. Cuatro plantas dentro de una caja.

Figura 7. Mortalidad *knockdown* (de derribo) del aceite de eucalipto (1 % p/v) en *Tetranychus urticae*.

Figura 8. Mortalidad *knockdown* (de derribo) del geraniol (1 % p/v) en *Tetranychus urticae*

Figura 9. Mortalidad *knockdown* (de derribo) de la composición biopesticida (0,06 % p/v) en *Tetranychus urticae*

5 Figura 10. Curva isobólica de mortalidad por contacto con ingredientes activos de composición biopesticida.

Figura 11. Curva isobólica del efecto antialimentario (repelente) de los ingredientes activos de la composición biopesticida.

10 Figura 12. Análisis isobolográfico de la mezcla de aceite *Satureja montana*: geraniol: isoblograma para una combinación de un determinado aceite de *Satureja montana* EC50 (A, abscisas) y un geraniol EC50 (B, ordenadas).

Figura 13. Análisis isobolográfico de una mezcla de aceite de *Ocimum basilicum*: Carvacrol. Isoblograma para una combinación de un determinado aceite de *Ocimum basilicum* EC80 (A, abscisas) y un Carvacrol EC80 (B, ordenadas).

15 Figura 14. Material vegetal con *Panonychus citri*.

Figura 15. Eficacia de la composición para el control de *Panonychus citri*: a) aplicación previa, b) primer día postaplicación c) cuarto día postaplicación.

Figura 16. Plántulas de vid con *Brevipalpus chilensis*.

20 Figura 17. Hoja de aguacate con *Olygonychus yothersi*

Descripción de las realizaciones

Salvo que se defina lo contrario, todos los términos de técnica, anotaciones y cualquier otro término o terminología científica incluidos en este documento tienen el significado
25 comúnmente entendido por los expertos en la técnica a la que pertenece esta invención. En determinados casos, a lo largo del documento se definen términos con significados comúnmente entendidos para mayor claridad o como referencia. La inclusión de estas definiciones dentro del documento no debe interpretarse necesariamente como una diferencia sustancial respecto de lo que generalmente se entiende. Muchas de las
30 técnicas y procedimientos descritos o referenciados en este documento se entienden bien y se emplean comúnmente con la metodología convencional por parte de expertos.

Las formas singulares incluyen referencias plurales a menos que el contexto indique claramente lo contrario.

Entendemos como antialimentario una sustancia que actúa sobre el comportamiento de los insectos, dificultando su alimentación, asentamiento y oviposición.

En la presente invención, entendemos como efecto conductual otro tipo de mecanismo de acción de los biopesticidas, que sucede cuando la composición provoca cambios en el comportamiento de los animales, por ejemplo, repelencia y antialimentación. Se puede apreciar observando el movimiento desorientado de un organismo animal que se aleja de un estímulo, posiblemente por las interacciones de los ingredientes activos en los receptores olfativos y gustativos.

- 10 Biopesticida: La Agencia de Protección Ambiental de Estados Unidos de América (EPA) describe a los biopesticidas como determinados tipos de biopesticidas derivados de materiales naturales como animales, plantas, bacterias y ciertos minerales. Los biopesticidas incluyen sustancias naturales que controlan las plagas (pesticidas bioquímicos), microorganismos que controlan las plagas (pesticidas microbianos) y
- 15 sustancias pesticidas producidas por plantas que contienen material genético agregado (protectores incorporados a las plantas o PIP).

Según la EPA, los biopesticidas se dividen en tres clases principales:

- 20 1. Los pesticidas bioquímicos son sustancias naturales (o sustancias sintéticas estructuralmente parecidas) que controlan las plagas a través de mecanismos no tóxicos. Por el contrario, los pesticidas convencionales son habitualmente materiales sintéticos que matan directamente o inactivan la plaga, lo que conlleva efectos tóxicos sobre el sistema nervioso y digestivo.
- 25 2. Los pesticidas microbianos son un microorganismo (por ejemplo, una bacteria, hongo, virus o protozoo) como ingrediente activo. Los pesticidas microbianos pueden controlar muchos tipos de plagas, aunque cada ingrediente activo, por separado, es relativamente específico para su(s) plaga(s) objetivo. Así, por ejemplo, hay hongos que controlan ciertas malezas y otros que matan insectos
- 30 3. Los protectores incorporados a las plantas (PIP) son sustancias pesticidas producidas por las plantas a partir de material genético que se les ha incorporado. Por ejemplo, los científicos pueden tomar el gen de la proteína insecticida de la bacteria Bt e introducirlo en el material genético de la propia
- 35 planta.

Mezcla: en este documento, «la mezcla», «mezcla» o «mezcla de ingredientes activos» son la combinación de ingredientes activos reivindicados en la presente invención.

Composición: en el presente documento, «composición» se define como una combinación o mezcla de ingredientes activos y otro compuesto, portador, composición
5 o elemento inerte (por ejemplo: urfactante o humectante).

La cantidad o dosis efectiva, como se usa en este documento, es una cantidad suficiente para lograr los resultados deseados. Se puede administrar una cantidad efectiva en una o varias aplicaciones. En cuanto al tratamiento, se considera protección contra plagas.

«Aceite esencial», «aceite» o «aceite esencial volátil», tal y como se usa el presente
10 documento, es cualquier aceite derivado de cualquier parte de una planta, incluido cualquier compuesto purificado o derivado de un aceite vegetal, como un compuesto orgánico volátil e hidrofóbico producido por una especie vegetal. Un aceite esencial de una planta utilizado en una composición como la aquí descrita no necesita estar aislado de una planta; es decir, puede por ejemplo sintetizarse químicamente o aislarse de un
15 microorganismo que produce el compuesto.

«Knock-Down (de derribo)», tal y como se utiliza en este documento, se define como cualquier cambio de comportamiento (reversible o no) después de la exposición a un compuesto objetivo y se produce a través de un modo/mecanismo de acción no tóxico que incluye efectos letales (contacto físico) y no letales (repelente, antialimentario).

20 En la presente invención, «efecto físico» o «contacto físico» se entiende como un tipo de mecanismo de acción de los biopesticidas, que ocurre cuando la composición en contacto con los organismos y disuelve o altera las membranas celulares (choque osmótico), y asfixia provocando la muerte por falta de oxígeno debido al bloqueo del sistema traqueal.

25 En la presente invención, la inhibición del asentamiento se considera un efecto repelente indirecto.

«Sinergia», tal y como se utiliza en el presente documento, es un efecto observado por una combinación de compuestos, mayor que el que se hubiera esperado a partir de una consideración de las contribuciones individuales. Esto se puede aplicar en la presente

invención, tanto a un efecto biopesticida aumentado como a una cantidad efectiva reducida, preferentemente a ambos.

Los terpenos, terpenoides o isoprenoides, tal y como se utilizan en el presente documento, son una clase de productos naturales que consisten en compuestos con la fórmula $(C_5H_8)_n$. Los terpenos se clasifican, además, por el número de carbonos. En la presente invención, los terpenos pueden denominarse indistintamente monoterpenos (C_{10}).

Una realización ejemplar de la presente invención, la composición biopesticida con efecto sinérgico comprende aceite esencial de *Eucalyptus globulus* y geraniol como componentes biopesticidas. Ambos componentes se obtienen mediante el siguiente proceso:

Ejemplo 1: Método de obtención del aceite esencial y su caracterización

Los componentes volátiles de *Eucalyptus globulus*, incluido el aceite esencial, se pueden obtener mediante métodos de extracción convencionales y avanzados. Los métodos de extracción convencionales incluyen: hidrodestilación, destilación al vapor, hidrodifusión, extracción con disolventes (acetona, hexano, etanol, metanol, éter de petróleo, entre otros). Aplicación de maceración y/o reflujo (por ejemplo, Soxhlet). Entre los métodos de extracción avanzados se encuentran la extracción con fluidos supercríticos, la extracción asistida por microondas y la extracción asistida por ultrasonido.

En una realización de la presente invención, se utiliza el método de destilación para obtener aceite esencial de *Eucalyptus globulus*, extraído de hojas frescas y agua como disolvente único. Las hojas frescas de *Eucalyptus globulus* se sometieron a una destilación con vapor a presión en una planta de destilación de acero inoxidable equipada con una cámara de destilación de 1400 kg que trabaja en un rango de presión de 0,5-1,0 bar. El vapor elimina la fracción volátil de los tejidos vegetales y se condensa en líquido a través de un condensador. Por último, el aceite esencial se separa en un recipiente florentino.

Cada lote fabricado de aceite de *Eucalyptus globulus* se analiza con cromatografía de gases y espectrometría de masas en tándem (GC-MS-MS) utilizando un cromatógrafo

de gases Agilent 7890B (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, EE. UU.) acoplado a un detector de masas Agilent 7000D GC/TQ (ionización electrónica, 70 eV) (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, EE. UU.).

Ejemplo 2: Procedimiento para la obtención de geraniol y su caracterización

En una realización de la presente invención, el terpeno es geraniol, se obtiene a partir del citral como precursor. Citral (CAS: 5392-40-5) tiene dos isómeros: Citral A (trans) o geranial y citral B (cis) o neral. La hidrogenación de citral se utiliza como modelo de reacción para la obtención de geraniol y otras moléculas. El citral (I) muestra sitios reactivos clave para la hidrogenación de citral. La hidrogenación del grupo carbonilo (a) produce isómeros cis y trans del 3,7-dimetil-6-octen-1-ol, concretamente, nerol y geraniol, respectivamente.

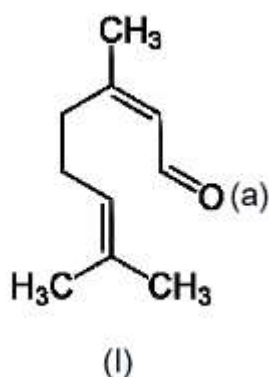
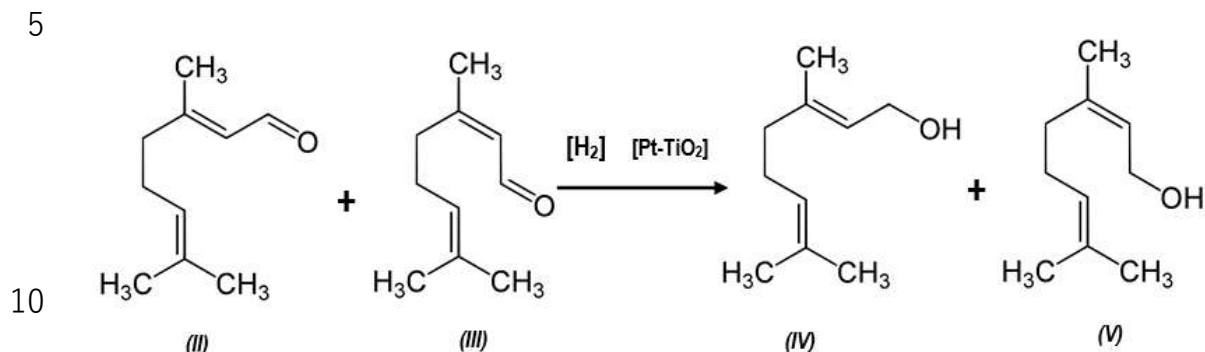


Tabla 1: Materias primas utilizadas en el proceso de fabricación de geraniol

Nombre del producto / nombre químico	Nombre del producto / nombre químico	Pureza
Citral (mezcla de isómeros) • <i>Trans</i>: 55-70 % • <i>Cis</i>: 30-45 %	5392-40-5	98,0 %
Óxido de titanio (TiO ₂)	13463-67-7	99,9 %
Platino (Pt)	7440-06-4	99,9 %

El proceso de fabricación de geraniol (CAS 106-24-1) se realiza en un reactor discontinuo de acero inoxidable STR (reactor de tanque agitado). La **Tabla 1** muestra la adición de catalizador Pt-TiO₂ reducido a 300-500 °C (reducción de temperatura elevada) según la metodología propuesta por Rojas-Sarmiento et. al. (2005). La

reacción de hidrogenación, donde (II) citral trans, (III) citral cis, (IV) geraniol (95%) y (V) nerol (2 %) es la siguiente:



Se llevó a cabo la detección de compuestos marcadores en el proceso (geraniol) con cromatografía de gases y espectrometría de masas en tándem (GC-MS-MS) utilizando un cromatógrafo de gases Agilent 7890B (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, EE. UU.) acoplado a un detector de masas Agilent 7000D GC/TQ (ionización electrónica, 70 eV) (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, EE. UU.). El ingrediente principal después de la hidrogenación (trans-geraniol) tiene una pureza ≥ 95 %. Sin embargo, la hidrogenación de los dos isómeros de citral (materia prima, Tabla 1) produce trans-geraniol (geraniol, >95 %) y cis-geraniol (nerol, $< 1,5$ %). No se detectan impurezas en cuanto a los catalizadores (TiO₂ y Pt).

Ejemplo 3 Procedimiento para obtener la composición biopesticida

Se describe una realización del procedimiento de fabricación de la presente invención. La composición consta de los siguientes compuestos, divididos en ingredientes activos e inertes, y en diferentes concentraciones. En un porcentaje hasta llegar al 100 % de la composición total se añade agua.

Tabla 2. Componentes de la composición

Componente	Ingrediente	Número CAS	Concentración p/v
Aceite de hoja de <i>Eucalyptus</i>	activo	8000-48-4	15,0 %
Geraniol	activo	106-24-1	15,0 %
Lecitina de soja	inerte	8002-43-5	5,0 %
Organosiloxano	inerte	67674-67-3	25,0 %
Atlas G-5002L	inerte		12,5 %

El proceso de fabricación consiste en los siguientes pasos secuenciales: Primer paso: se formula la composición en el reactor (Figura 1) siguiendo atentamente el orden de incorporación de los componentes (Tabla 3). En el reactor se pueden diferenciar los siguientes componentes: (a) Tanque de acero inoxidable de 650 litros (volumen total) y 560 litros (volumen útil). Dispone de una doble camisa por donde puede circular un fluido térmico que permite controlar la temperatura del producto que se encuentra en el interior del reactor mediante una sonda de temperatura PT100. Cuenta con dos agitadores (b) tipo cowles con una velocidad máxima de 1500 rpm y (c) un emulsionador de alto cizallamiento con una velocidad máxima de 3000 rpm, ambos controlados por inversores que permiten regular la velocidad de giro. El tanque está conectado a una (d) bomba de vacío que puede ser utilizada para eliminar burbujas de aire en el producto y evitar la formación de interfaces gas-líquido. Además, está equipado con un (e) sistema de inyección de gas inerte (por ejemplo, nitrógeno) para evitar trabajar en presencia de oxígeno, lo cual que podría deteriorar el producto por reacciones de oxidación. Para controlar la presión o el vacío en el interior del reactor, está equipado con un manómetro y un manómetro de vacío. Además, cuenta con una instalación de limpieza automática CIP. Los parámetros de velocidad de rotación de cada agitador y la temperatura del producto se detallan en la Tabla 3. Cabe destacar que esta formulación no utiliza ningún gas inerte.

Tabla 3. Orden y condiciones generales fijadas durante la formulación

Ingrediente	Agitador / rpm	Vacío dentro del tanque	% (p/v)	Orden	Tiempo (min)	Temperatura del producto
Fluido XIAMETER™ OFX-5211	Cowles/1000 rpm	760 mbar	26,0	1	0	25 °C
Aceite de hojas de <i>Eucalyptus globulus</i>	Cowles/700 rpm	760 mbar	15,0	2	10	25 °C
Geraniol	Cowles/700 rpm	760 mbar	15,0	3	10	25 °C
ATLAS G-5002L	Cowles/1000 rpm	500 mbar	12,5	4	10	35 °C
Lecitina de soya	Cowles/1000 rpm Emulsionante de alto cizallamiento/1000 rpm	500 mbar	5,0	5	15	35 °C

Agua y agitación continua	Cowles/700 rpm	760 mbar	26,5	6	30	25 °C
---------------------------	----------------	----------	------	---	----	-------

Segundo paso: analizar la composición fabricada con cromatografía de gases, espectrometría de masas en tándem (GC-MS-MS), cromatografía líquida y espectrometría de masas en tándem (LC-MS-MS). En este paso, el objetivo principal es determinar la identidad química de la fórmula mediante la identificación del compuesto químico previamente definido. También tiene como objetivo detectar posibles impurezas elementales en el proceso de fabricación. Si se tiene en cuenta que los compuestos de la composición son aceites esenciales volátiles y monoterpenos, seleccionamos GC-MS-MS como método analítico preferido para realizar el control de calidad. Los compuestos procedentes del aceite de *Eucalyptus* y geraniol están bien identificados y cuantificados.

Ejemplo 4: Efectos biopesticidas de la composición de la presente invención

Una realización de la composición descrita (**Tabla 2**) que comprende la mezcla de ingredientes activos se prueba para el control de la araña roja (*Tetranychus sp.*, *Eutetranychus sp.*) en cultivos alimentarios/agrícolas y también en cultivos no alimentarios. Se recogieron ácaros (*Tetranychus urticae*) de diez poblaciones diferentes de adultos de los mismos invernaderos en Almería (sureste de España). Los ácaros adultos (200 de cada sitio de recolección) se capturaron de forma manual de las hojas de diferentes cultivos (tomate, pimiento, berenjena y calabacín) con un cepillo entomológico. El «conjunto» de plagas de ácaros se crio en plantas sanas *Phaseolus vulgaris* (frijol) y mantenido en cámara de crecimiento del tipo «walk-in» a 25 (±2) °C, 60 % de humedad relativa (HR) y un fotoperíodo de 16 h de luz y 8 h de oscuridad hasta su uso.

Se prepararon una serie de diluciones (1,0 %, 0,5 %, 0,1 % y 0,05 % peso/volumen) de ingrediente activo independiente de aceite de *Eucalyptus* y geraniol (**Tabla 4**) a partir de las soluciones madre originales (150 mg/ml) utilizando una solución de TWEEN-80® (2 %) en agua como portador. Asimismo, se preparó una composición que incluye mezclas de ingredientes activos (aceite de *Eucalyptus* + geraniol (0,03 % + 0,03 %), (0,06 % + 0,06 %) y (0,09 % + 0,09 %) con el mismo portador.

Con la prueba de la actividad biopesticida de la composición reivindicada en la presente invención se han realizado bioensayos con el objetivo de evaluar la eficacia a través de los distintos mecanismos de acción (MoA) mencionados. Los bioensayos se han diseñados recientemente y/o han sido adaptados de la literatura científica Roh et al. (2011), El-Moneim et al. (2012), Brown, et al. (2017), Ruiz-Vásquez et al. (2019), Bakkali et al. (2019). y Rincón et al. (2019).

4.1 Mortalidad por contacto (método del disco de hoja)

Este bioensayo busca evaluar el efecto físico de distintas dosis sobre la mortalidad de la araña roja *Tetranychus urticae* adulta en aplicación tópica a corto/medio plazo (0-24 horas).

Las pruebas se llevaron a cabo en placas de Petri de red de plástico (5 cm de diámetro) (Figura 2). (a) El fondo de la placa de Petri se cubrió con una capa fina (0,4 mm) de agar 12 % (p/v). Al cabo de 2 minutos de enfriamiento del agar, (b) se colocaron los discos de hoja de frijol silvestre (*Phaseolus vulgaris*) (de 2 cm²) sobre la superficie de agar fresco (con la parte superior hacia arriba) y se dejaron secar durante 30 minutos. Esto brinda soporte e hidratación del disco a lo largo del experimento (24 h). Se colocaron quince (c) *Tetranychus urticae* adultos en la superficie superior de un disco de hoja de frijol silvestre con un pequeño cepillo entomológico. Se espero a que los ácaros se aclimataran durante 30 minutos. Se utilizaron un total de 10 placas de Petri para cada tratamiento (ingredientes activos individuales, mezcla de ingredientes activos, controles positivos y negativos) en cada experimento y se replicaron temporalmente 3 veces a lo largo de la semana.

Cada tratamiento (distintas dosis de ingredientes activos individuales, mezcla de ingredientes activos y controles) se pulverizó (50 µl) dos veces sobre los ácaros asentados y se cubrió la totalidad de la superficie del disco en cada placa de Petri con la ayuda de un microatomizador. Las botellas cerradas y etiquetadas se incubaron en una cámara de crecimiento de tipo compacto a 25 (±2) °C, 60 % de humedad relativa (HR) y un fotoperíodo de 16 h de luz y 8 h de oscuridad. Se hizo el recuento del número de ácaros adultos vivos y muertos 24 horas después del tratamiento. Los ácaros adultos se consideraron muertos tras no detectar ningún tipo de movimiento después de sondearlos con la punta de un pincel fino bajo una lupa estereoscópica. Se calculó el porcentaje de mortalidad en los grupos de tratamiento y control. Si la mortalidad en el

control negativo era superior al 20 %, se descartó la prueba. Si la mortalidad de control era mayor al 5 %, pero menor al 20 %, la mortalidad observada (%M) se corrigió utilizando la fórmula de Abbott (Abbott, 1925):

$$5 \quad \% \text{ Corregida } M = \frac{X-Y}{100-Y} \times$$

Donde: X= Mortalidad (%) en el tratamiento; Y= Mortalidad (%) en el control

10 Las medias de %M se compararon utilizando un análisis de varianza unidireccional (ANOVA, $p < 0,05$) y una prueba LSD como prueba *post hoc* para verificar diferencias destacadas entre tratamientos individuales con la ayuda del software Statgraphics Centurion XVII. Si se detectó alguna anomalía en los datos, se realizó una prueba adicional de Kruskal-Wallis y se presentó un diagrama de caja y bigotes (mediana Notch). Cada ingrediente activo y la mezcla se probaron en un experimento de dosis-
15 respuesta (3-5 diluciones seriadas) para calcular su potencia relativa (EC_{50} y/o EC_{90}) a partir de un análisis de regresión lineal (%M en dosis logarítmica). También se observaron cuidadosamente los ácaros adultos muertos con una lupa estereoscópica para distinguir los mecanismos de acción involucrados en la mortalidad por contacto, como: Bloqueo de los espiráculos traqueales de los insectos (asfixia) y efecto sobre la
20 cutícula y/o membranas de los insectos (shock osmótico).

Tabla 4. Mortalidad por contacto de los elementos de prueba contra el ácaro *Tetranychus urticae*

Tratamientos	Núm.	Dosis % (p/v)	Mortalidad (%M)
Aceite de hoja de <i>Eucalyptus</i>	1	0,05	36,4 ± 2,5
	2	0,10	51,4 ± 1,8
	3	0,50	55,3 ± 2,2
	4	1,0	73,4 ± 4,8
	EC_{50} (% p/v) = 0,15 (0,11, 0,19)		
geraniol	5	0,10	18,1 ± 2,4
	6	0,50	28,2 ± 3,2
	7	1,0	43,9 ± 2,5
	EC_{50} (% p/v) = 2,44 (1,24, 4,75)		
mezcla Aceite de <i>Eucalyptus</i> : geraniol	8	0,03 : 0,03	67,8 ± 2,6
	9	0,06 : 0,06	92,1 ± 1,6
	10	0,09 : 0,09	97,3 ± 0,8

(Control positivo, químico)	11	0,06	83,3 ± 2,4
(Control positivo, de base natural)	12	0,5	75,3 ± 2,9

La mortalidad por contacto en *Tetranychus urticae* adultos probados para cada ingrediente activo (aceite de hoja de *Eucalyptus* y geraniol) y la mezcla utilizada en este estudio. La Tabla 4 muestra los resultados, donde %M es el % de mortalidad corregida de Abbott. Las medias de la misma columna seguidas de la misma letra no son significativamente distintas (ANOVA, Kruskal-Wallis, $p < 0,05$).

El aceite de hoja de *Eucalyptus* mostró una mortalidad por contacto significativa en *Tetranychus urticae* adultos, la dosis más alta probada de aceite (1 % p/p) alcanza un 73,4 % de mortalidad de los ácaros. El geraniol obtuvo una mortalidad baja con la misma dosis, alrededor de un 30 % menor que el *Eucalyptus*. Como resultado, la composición mostró un buen desempeño en todas las dosis probadas, incluso siendo la concentración de dosis menor que cada ingrediente activo de forma independiente. En todos los casos, la eficacia (expresada como mortalidad por contacto, %M) de la mezcla es mayor que la de cada ingrediente activo de forma independiente.

4.2 Efectos de los antialimentarios (disuasivos de la alimentación)

Este bioensayo tiene por objetivo evaluar el efecto de distintas dosis de ingredientes activos individuales y la composición biopesticida sobre el comportamiento del asentamiento del ácaro *Tetranychus urticae*. Se basa en la preferencia de los ácaros adultos por las planta de frijol silvestre (*Phaseolus vulgaris*) tratado y no tratado ubicados en las mismas placas de Petri (ensayos *in vitro*) o cajas entomológicas (ensayos *in planta*):

- La inhibición *in vitro* de asentamiento (método de pintura de discos de hojas)

Las pruebas se llevaron a cabo en placas de Petri de red de plástico (5 cm de diámetro) (Figura 3). El fondo de la placa de Petri se cubrió con una capa fina (0,4 mm) de agar 12 % (p/v) (a). Al cabo de 2 minutos de enfriamiento del agar se colocaron los discos de hoja de frijol silvestre (*Phaseolus vulgaris*) (de 2 cm²) sobre la superficie de agar fresco (con la parte superior hacia arriba) y se dejaron secar durante 30 minutos. Esto brinda soporte e hidratación del disco a lo largo del experimento (24 h). La mitad de los discos se trataron (T) con 20 µl de los ingredientes activos individualmente, y la mezcla y la

otra mitad con agua con un 2 % de TWEEN® 80 que se utilizó como control (C). Quince *Tetranychus urticae* adultos se colocaron en el medio de discos de hojas tratados y no tratados, y se dejaron alimentar (24 h) en una cámara de crecimiento de tipo compacto a 25 (±2) °C, 60 % de humedad relativa y un fotoperíodo de 16 h de luz y 8 h de oscuridad. Se utilizaron un total de 10 placas de Petri para cada tratamiento en cada experimento y se replicaron temporalmente 3 veces a lo largo de la semana.

Tabla 5. Efecto antialimentarios *in vitro* contra el ácaro *Tetranychus urticae*

Tratamientos	Núm.	Dosis % (p/v)	Inhibición del asentamiento (%SI)
Aceite de <i>Eucalyptus</i>	1	0,10	29,6 ± 4,6*
	2	0,50	43,5 ± 5,1*
	3	1,0	65,6 ± 3,8*
Geraniol	4	0,02	31,1 ± 4,4*
	5	0,05	47,5 ± 4,6*
	6	0,10	70,6 ± 3,0*
	7	0,50	75,3 ± 3,4*
	8	1,0	82,9 ± 2,5*
mezcla Aceite de <i>Eucalyptus</i> : Geraniol	9	0,03 : 0,03	62,5 ± 3,2*
	10	0,06 : 0,06	83,1 ± 2,9*
	11	0,09 : 0,09	90,6 ± 1,6*
(Control positivo, químico)	12	0,06	52,1 ± 3,4*
(Control positivo, de base natural)	13	0,5	83,9 ± 3,4*

Los estudios de inhibición del asentamiento se consideran un indicador de efectos repelentes. La **Tabla 5** muestra efectos antialimentarios *in vitro* contra el ácaro *Tetranychus urticae* probado para cada ingrediente activo (aceite de hoja de *Eucalyptus* y geraniol) y la mezcla. %SI es el índice de inhibición del asentamiento expresado como el efecto de los tratamientos sobre el comportamiento de asentamiento de los ácaros. El geraniol mostró un efecto antialimentario más fuerte que el aceite de hoja de *Eucalyptus*. Tal y como sucede en los bioensayos de mortalidad por contacto, la composición mostró la actividad antialimentaria más fuerte en *Tetranychus urticae* adultos con concentraciones bajas (0,06 % p/v y 0,09 % p/v) en comparación con dosis individuales de ingredientes activos. El asterisco (*) marca una significancia estadística.

- Inhibición del asentamiento *in planta* (método directo en planta entera)

Los experimentos se realizaron cajas de cría tipo bugdorm® (60x60x60 cm, malla de 140 micras) (Figura 4). Colocando en el interior macetas de 14 cm de diámetro con dos plantas de frijol silvestre de dos hojas en cada maceta (Figura 5). Una de las plantas fue rociada con la composición de la presente invención y la otra con el control, y se dejaron secar durante 30 minutos. Los ácaros adultos (hasta 100) fueron liberados en la base de los tallos entre las dos plantas (tratadas y no tratadas). Así, tuvieron que elegir entre dos alternativas o permanecer caminando y/o descansando de camino a la caja. Se utilizaron un total de 5 cajas para cada tratamiento (cuatro plantas en cada una) (Figura 6) y se realizó el control en cada experimento y se replicó 3 veces en días diferentes. Las cajas cerradas y etiquetadas se incubaron en una cámara de crecimiento de tipo «walk-in» a 25 (±2) °C, 60 % de humedad relativa (HR) y un fotoperíodo de 16 h de luz y 8 h de oscuridad. Pasadas 24 horas, se registró el número de adultos asentados en plantas tratadas y no tratadas y el número de huevos puestos en ambos lados de la lámina de cada hoja. Se hizo el recuento de ácaros y huevos con un estereomicroscopio.

El índice de inhibición del asentamiento (%SI) se calculó de acuerdo con la siguiente fórmula:

$$\%SI = [1 - \left(\frac{T}{C}\right)] \times 100$$

T= Asentamiento de plantas tratadas; C= Asentamiento de plantas control.

El índice de inhibición de la oviposición (%IO) se calculó con base en la siguiente fórmula:

$$\%IO = [1 - \left(\frac{T}{C}\right)] \times 100$$

T= huevos puestos en plantas tratadas; C= huevos puestos en plantas de control.

Se analizaron las medias de %SI y %IO para definir su significancia mediante la prueba no paramétrica de rangos con signo de Wilcoxon (p < 0,05). El asterisco (*) marca una significancia estadística.

Tabla 6. Efecto antialimentarios *in planta* contra el ácaro *Tetranychus urticae*

Tratamiento	Núm.	Dosis % (p/v)	Inhibición del asentamiento (%SI)	Inhibición de la oviposición (%IO)
Aceite de <i>Eucalyptus</i>	1	0,10	40,9 ± 4,6	52,8 ± 4,3*
	2	0,50	52,8 ± 4,4	76,9 ± 2,3*
	3	1,0	58,5 ± 5,8	81,6 ± 2,4*
Geraniol	4	0,10	57,7 ± 5,3	44,3 ± 3,7*
	5	0,50	73,2 ± 2,6	72,1 ± 3,1*
	6	1,0	76,1 ± 2,7	81,1 ± 2,1*
Composición Aceite de <i>Eucalyptus</i> : Geraniol	7	0,06 : 0,06	83,9 ± 2,2	89,2 ± 0,9*
(Control positivo), (químico)	8	0,06	57,3 ± 4,1	72,8 ± 2,5*
Control positivo, de base natural	9	0,5	73,6 ± 2,6	74,3 ± 2,3*

La **Tabla 6** muestra el número de huevos como un indicador de la inhibición de la puesta de huevos. Cabe destacar que la inhibición de la puesta de huevos puede estar relacionada con la inhibición del asentamiento (inhibición indirecta de la oviposición) o no (efecto directo sobre el comportamiento de la oviposición). Los resultados *in vivo* (*in planta*) avalaron los resultados previos obtenidos en condiciones *in vitro*.

Tabla 5. Por lo que se refiere a la inhibición del asentamiento, el geraniol tuvo un mejor rendimiento que el aceite de *Eucalyptus*. Por su lado, el aceite de *Eucalyptus* inhibió la oviposición en una mayor proporción que el geraniol. La eficacia de la composición con una concentración del 0,06 %, mucho menor que la del ingrediente activo de forma independiente, tanto en el asentamiento como en la oviposición, fue mayor que la de los dos controles positivos evaluados.

La **Tabla 7** muestra el resumen del mecanismo de acción (MoA) propuesto para la composición biopesticida de acuerdo con los resultados presentados aquí. La combinación de los ingredientes activos (mezcla) permite que la formulación final del biopesticida tenga mecanismos de acción diferentes y más potentes que los ingredientes activos de forma independiente.

Tabla 7. Resumen de los MoA para la composición biopesticida

Mecanismo de acción	Mecanismo de acción	Reacción	Ingrediente principal involucrado	Ingrediente secundario involucrado
Choque osmótico físico (contacto)	Alteración de la cutícula/membrana (solubilización de cera/lípidos)	Deshidratación, choque osmótico	Aceite de <i>Eucalyptus</i>	-
Comportamiento (antialimentario)	Interacción con las sensilas gustativas y olfativas	Inhibición del asentamiento / Disuasión de la alimentación	Geraniol	Aceite de <i>Eucalyptus</i>
		Inhibición de la oviposición	Aceite de <i>Eucalyptus</i>	Geraniol

4.3 Bioensayos *knock-down* (de derribo)

También se procedió a probar la composición de la presente invención para evaluar su efecto de reducción en los ensayos de mortalidad por contacto de los ingredientes activos individuales y de la mezcla. Al igual que en el bioensayo de mortalidad por contacto, la mortalidad se evaluó 1, 2, 4, 6, 8, 16 y 24 horas después de pulverizar la mezcla de aceite de *Eucalyptus* y geraniol. Para los ingredientes activos individuales (aceite de *Eucalyptus* y geraniol), utilizamos la dosis con mayor actividad en ensayos de contacto (tópicos) 1 % p/v **Tabla 4**. La mezcla se preparó al 0,06:0,06 % p/v (aceite de *Eucalyptus*: geraniol) para los bioensayos con la composición biopesticida.

La figuras 7 y 8 muestran el efecto *knock-down* del aceite de *Eucalyptus* y del geraniol respectivamente. Para ambos ingredientes, se observó una curva de derribo suavizada con un aumento lento y gradual de la mortalidad a lo largo del tiempo. Se observó este mismo comportamiento en la composición biopesticida (**Figura 9**). Las curvas abruptas que muestran alta mortalidad en una hora son indicativas de efectos neurotóxicos. No obstante, las curvas más suaves podrían utilizarse como indicativas de un mecanismo de acción no tóxico.

Ejemplo 5: Evaluación del efecto sinérgico

Varias realizaciones de la presente invención muestran, asombrosamente, la interacción entre dos compuestos como un aceite esencial de plantas y un terpeno. El efecto sinérgico se genera por esta interacción.

Hay varios métodos matemáticos disponibles para probar la aditividad de la composición pesticida. En la presente invención se han probado los siguientes métodos para demostrar el efecto sinérgico:

5 • **Ecuación de Limpel**

Un método diseñado por Limpel et al. 1962, que permite el cálculo de la respuesta esperada de la combinación de plaguicidas de esta forma:

10 Si X = porcentaje de eficiencia de la sustancia A, e Y = porcentaje de eficiencia de la sustancia B, y E = porcentaje de eficiencia esperado al mezclar A y B

$$E = X + Y - \frac{X \cdot Y}{100}$$

Cuando la respuesta observada es mayor que la esperada, la combinación se considera sinérgica. Si es menor, será antagónica. Si ambas respuestas (observadas y esperadas) son iguales, la combinación es aditiva.

15

• **Método de las isóboles**

Actualmente, es el método más utilizado para demostrar el efecto sinérgico en una combinación (Williamson 2001). Aunque es más complicado, es independiente del mecanismo de acción y se aplica en la mayoría de las condiciones. Tampoco hace suposiciones sobre el comportamiento de cada componente y, por lo tanto, es aplicable a mezclas de múltiples componentes. Cuando hablamos de isóboles, no referimos a una curva de isoeffecto en la que una combinación de componentes se representa en un gráfico, cuyos ejes son los ejes de dosis del componente individual. Si los componentes no interaccionan, la isóbola, la línea que une los puntos que representan la combinación con los de las tasas de dosis que representan las dosis individuales con el mismo efecto que la combinación, será recta. Si se produce sinergia, la isóbola no será recta sino curva y, entonces, se dice que la curva es «cóncava». Para el antagonismo ocurre justo lo contrario: la dosis de la combinación es mayor de lo esperado y produce una isóbola «convexa».

30

5.1 Aceite de *Eucalyptus*: geraniol

Los datos de eficacia (% de mortalidad por contacto) obtenidos de la **Tabla 4** se utilizan para aplicar la ecuación de Limpel: X (aceite de *Eucalyptus*) es una mortalidad relacionada del 51,4 % con una dosis de 0,1 % p/v, Y (geraniol) es una mortalidad del

18,1 % relacionada con una dosis de 0,1 % p/v y E es el porcentaje de mortalidad esperado por combinación:

$$E = 51.4 + 18.1 - (51.4 \times 18.1) / 100 = \mathbf{60.19\% \textit{mortalidad}}$$

La composición biopesticida (**Tabla 4**) es una dosis de 0,09 % p/v más cercana al 0,1 % p/v de cada ingrediente activo. Si consideramos esta dosis, su mortalidad es del 97,3 %, bastante superior al porcentaje de mortalidad esperado. Como resultado, la composición biopesticida reivindicada en la presente invención es sinérgica.

En otro caso, los datos de eficacia (% inhibición del asentamiento) obtenidos de la **Tabla 5** se utilizan para aplicar la ecuación de Limpel: X (aceite de *Eucalyptus*) tiene un efecto antialimentario del 29,6 % relacionado con una dosis de 0,1 % p/v, Y (geraniol) tiene un efecto antialimentario del 70,6 % relacionado con una dosis de 0,1 % p/v, y E es el porcentaje de efecto antialimentario esperado por combinación:

$$E = 29.6 + 70.6 - \frac{(29.6 \times 70.6)}{100} = \mathbf{79.31\% \textit{efecto antialimentario}}$$

La composición biopesticida (**Tabla 5**) es una dosis de 0,09 % p/v más cercana al 0,1 % p/v de cada ingrediente activo. Si consideramos esta dosis, su efecto antialimentario es del 90,6 %, bastante superior al porcentaje de efecto antialimentario esperado. Como resultado, la composición biopesticida reivindicada en la presente invención es sinérgica.

La **Tabla 8** muestra el porcentaje experimental (%M) de mortalidad por contacto contra ácaros adultos de *Tetranychus urticae*. *p<005, prueba de rangos con signo de Wilcoxon. (%p/v). Probado para distintas combinaciones de ingredientes activos que se pueden encontrar en la composición biopesticida.

Tabla 8. Mortalidad por contacto de las combinaciones probadas contra el ácaro *Tetranychus urticae*

Combinación sinérgica (Aceite de <i>Eucalyptus</i>) + (geraniol)		Mortalidad por contacto (%M)
Dosis de (aceite de <i>Eucalyptus</i>) (%p/v)	Dosis de (geraniol) (%p/v)	
0,02	1,75	59,4 ± 3,4*

0,03	1,10	50,3 ± 8,5*
0,04	0,75	58,6 ± 2,3*
0,06	0,42	53,2 ± 3,4*
0,07	0,30	49,5 ± 3,2*
0,08	0,10	47,8 ± 3,8*

(Figura 10) La línea recta que une los puntos que representan EC₅₀ son todas las dosis combinadas para producir el efecto aditivo si no ocurre interacción, isóbola. La curva más pronunciada hacia arriba se refiere a EC₅₀ y cada una de las combinaciones probadas es cóncava. La sinergia se muestra mediante la curva cóncava o isóbola cóncava, en la que el porcentaje de mortalidad experimental por contacto alcanza alrededor del 50 % (**Tabla 8**) por dosis bajas de ambos componentes en contraste con los dosis EC₅₀ de componentes independientes.

- 10 El método de las isóbulas también se puede utilizar para demostrar el efecto sinérgico a través de ensayos de inhibición del asentamiento.

La **Tabla 9** muestra el porcentaje experimental (%SI) de inhibición del asentamiento contra ácaros adultos de *Tetranychus urticae*. *p<005, prueba de rangos con signo de Wilcoxon. (%p/v) Probado para distintas combinaciones de ingredientes activos que se pueden encontrar en la composición biopesticida.

Tabla 9. Efecto antialimentario de las combinaciones probadas contra el ácaro *Tetranychus urticae*

Combinación sinérgica (Aceite de <i>Eucalyptus</i>) + (geraniol)		Inhibición del asentamiento (%SI)
Dosis de (aceite de <i>Eucalyptus</i>) (%p/v)	Dosis de (geraniol) (%p/v)	
0,28	0,006	50,1 ± 2,4*
0,23	0,010	56,5 ± 4,8*
0,17	0,015	57,9 ± 4,1*
0,10	0,020	49,8 ± 1,7*
0,05	0,025	52,3 ± 3,7*
0,04	0,035	49,5 ± 2,0*
0,01	0,040	53,1 ± 3,0*

(Figura 11) La línea recta que une los puntos que representan EC_{50} son todas las dosis combinadas para producir el efecto aditivo si no ocurre interacción, isóbola. La curva más pronunciada hacia arriba se refiere a EC_{50} y cada una de las combinaciones probadas es cóncava. La sinergia se muestra mediante la curva cóncava o isóbola cóncava, en la que el porcentaje de inhibición del asentamiento relacionado con el efecto antialimentario alcanza alrededor del 50 % (Tabla 9) por dosis bajas de ambos componentes en contraste con los dosis EC_{50} de componentes independientes.

5.2 Aceite de *Satureja montana*: geraniol

En una realización de la presente invención, el aceite esencial de *Satureja montana* (ajedrea) se extrajo de las partes aéreas durante la floración por destilación a vapor.

La dosis efectiva de mortalidad por contacto (EC_{50} , dosis necesaria para alcanzar el 50 % del efecto) se calculó para el aceite de *Satureja montana* (Tabla 10). En el caso del geraniol, la dosis efectiva fue la indicada previamente en la Tabla 4.

La Tabla 10 muestra la mortalidad por contacto en el ácaro *Tetranychus urticae* obtenido con el aceite de *Satureja montana*, geraniol y la mezcla (aceite de *Satureja montana* + geraniol). La mortalidad (%M) se corrige utilizando la fórmula de Abbott. Las medias de la misma columna seguidas de la misma letra no son significativamente distintas (ANOVA, Kruskal-Wallis, $p < 0,05$).

Tabla 10. Mortalidad por contacto de los tratamientos probados contra el ácaro *Tetranychus urticae*

Tratamiento	Núm.	Dosis % (p/v)	Mortalidad (%M)
Aceite de <i>Satureja montana</i>	1	0,01	$24,5 \pm 4,4^b$
	2	0,02	$44,1 \pm 1,8^c$
	3	0,07	$60,4 \pm 3,8^d$
	4	0,10	$62,5 \pm 7,6^d$
	$EC_{50} (\%, p/v) = 0,085 (0,07, 0,12)$		
geraniol	5	0,10	$18,1 \pm 2,4^a$
	6	0,50	$28,2 \pm 3,2^b$
	7	1,0	$43,9 \pm 2,5^c$
	$EC_{50} (\%, p/v) = 2,44 (1,24, 4,75)$		
Mezcla (1:5) Aceite de <i>Satureja montana</i> : geraniol	9	0,1 : 0,5	$98,1 \pm 1,6^e$

La **Tabla 11** muestra la mortalidad por contacto experimental (%M), calculada para distintas combinaciones de ingredientes activos que se pueden encontrar en la mezcla de aceite de *Satureja montana*: geraniol (*p<0,05, prueba de rangos con signo de Wilcoxon).

5

Tabla 11. Mortalidad por contacto de las combinaciones probadas contra el ácaro *Tetranychus urticae*

Combinación sinérgica (Aceite de <i>Satureja montana</i>) + (geraniol)		Mortalidad por contacto (%M)
Dosis de (aceite de <i>Satureja montana</i>) (%p/v)	Dosis de (geraniol) (%p/v)	
0,005	1,50	49,4 ± 5,2*
0,01	1,00	54,1 ± 3,7*
0,02	0,90	59,4 ± 8,5*
0,03	0,60	49,4 ± 2,5*
0,04	0,53	51,7 ± 3,2*
0,07	0,30	52,7 ± 2,0*
0,06	0,35	54,1 ± 5,6*
0,08	0,12	50,0 ± 2,2*

10

Los datos de eficacia (% de mortalidad por contacto) obtenidos de la **Tabla 10** se utilizan para aplicar la ecuación de Limpel: X (aceite de *Satureja montana*) es una mortalidad relacionada del 62,5 % con una dosis de 0,1 % p/v, Y (geraniol) es una mortalidad del 28,2 % relacionada con una dosis de 0,5 % p/v y E es el porcentaje de mortalidad esperado por combinación:

15

$$E = 62.5 + 28.2 - (62.5 \times 28.2) / 100 = \mathbf{73.08\% \textit{ mortalidad}}$$

20

La composición biopesticida (**Tabla 10**) es una dosis de 0,1 % p/v para el aceite de *Satureja montana* y 0,5 % para el geraniol. Si consideramos esta dosis, su mortalidad es del 98,1 %, bastante superior al porcentaje de mortalidad esperado. Como resultado, la composición biopesticida reivindicada en la presente invención muestra un efecto sinérgico.

Figura 12. La línea negra de doble punta une A con B y representa todas las combinaciones (pares de dosis) de A y B que, en teoría, son capaces de obtener los

mismos efectos (50 %). En el ejemplo, para el aceite de *Satureja montana* es 0,085 % (concentración con una mortalidad por contacto del 50 %) y para el geraniol, 2,44 %.

Si experimentalmente (**Tabla 11**), el 50 % de mortalidad se alcanza con concentraciones más bajas (por ejemplo, el punto S en la Figura 12), entonces la combinación dada mostraría sinergismo. Si hay sinergia entre dos ingredientes, la curva será cóncava y hacia arriba.

Si aplicamos el índice de combinación (I) propuesto por Chou y Talalay (1983):

$$CI = \frac{D1}{IDx1} + \frac{D2}{IDx2}$$

donde, D1 y D2 son las concentraciones de aceite de *Satureja montana* y geraniol, que aplicados juntos producen un efecto; *IDx1* y *IDx2* son las concentraciones que producen el mismo efecto cuando se administran solas. Por ejemplo, para el punto S (**Figura 12**) sería:

$$CI = \frac{0.02}{0.085} + \frac{0.9}{2.44}$$

El valor del CI (índice combinación) es 0,595. Según Chou y Talalay (1983), el CI puede tener valores entre 0 y 1 para la sinergia.

5.3 Aceite de *Ocimum basilicum*: carvacrol

En una realización de la presente invención, se extrajo el aceite esencial de *Socimum basilicum* (albahaca) de las partes aéreas por destilación a vapor. Se calculó la dosis efectiva de mortalidad por contacto (EC₈₀, dosis necesaria para alcanzar el 80 % del efecto) para el aceite de *Ocimum basilicum* y el carvacrol (**Tabla 12**). La mortalidad (%M) se corrige utilizando la fórmula de Abbott. Las medias de la misma columna seguidas de la misma letra no son significativamente distintas (ANOVA, Kruskal-Wallis, p<0,05).

Tabla 12. Mortalidad por contacto de los tratamientos probados contra el ácaro *Tetranychus urticae*

Tratamiento	Núm.	Dosis % (p/v)	Mortalidad (%M)
Aceite de <i>Ocimum basilicum</i>	1	0,01	19,4 ± 3,8
	2	0,05	27,7 ± 4,1

Carvacrol	3	0,10	40,6 ± 3,3
	4	0,50	60,1 ± 2,4
	5	1,0	71,4 ± 0,7
	6	1,5	82,5 ± 2,7
	EC ₈₀ (% p/v) = 1,37 (1,0, 2,3)		
	7	0,01	38,9 ± 5,1
Carvacrol	8	0,05	47,1 ± 7,2
	9	0,10	66,8 ± 5,3
	10	0,50	80,3 ± 4,4
	11	1,0	100,0 ± 0,0
	EC ₈₀ (% p/v) = 0,55 (0,42, 0,8)		

La **Tabla 13** muestra la mortalidad por contacto experimental (%M), calculada para distintas combinaciones de ingredientes activos que se pueden encontrar en el aceite de *Satureja montana*: Mezclas de carvacrol (*p<005, prueba de rangos con signo de Wilcoxon).

Tabla 13. Mortalidad por contacto para las combinaciones probadas contra el ácaro *Tetranychus urticae*

Combinación sinérgica (Aceite de <i>Ocimum basilicum</i>) + (Carvacrol)		Mortalidad por contacto (%M)
Dosis de (aceite de <i>Ocimum basilicum</i>) (%p/v)	Dosis de (Carvacrol) (%p/v)	
1,0	0,005	78,5 ± 6,1*
0,9	0,01	82,5 ± 2,2*
0,8	0,04	79,6 ± 4,4*
0,7	0,06	80,3 ± 1,2*
0,5	0,08	81,6 ± 3,8*
0,1	0,10	78,5 ± 3,1*
0,05	0,20	84,1 ± 4,2*

La Figura 13 muestra que la línea negra de doble punta une A con B y representa todas las combinaciones (pares de dosis) de A y B que, en teoría, son capaces de obtener los mismos efectos (80 %). En el ejemplo, para el aceite de *Ocimum basilicum* es 1,37 % (concentración con una mortalidad por contacto del 80 %) y para el Carvacrol, 0,55 %. Si experimentalmente (**Tabla 13**), el 80 % de mortalidad se alcanza con concentraciones más bajas (por ejemplo, el punto S en la Figura 13), entonces la combinación dada mostraría sinergismo. Si hay sinergia entre dos ingredientes, la curva será cóncava y hacia arriba.

Si aplicamos el índice de combinación (I) propuesto por Chou y Talalay (1983):

$$CI = \frac{D1}{IDx1} + \frac{D2}{IDx2}$$

5 donde, D1 y D2 son las concentraciones de aceite de *Ocimum basilicum* y Carvacrol, que aplicados juntos producen un efecto; IDx1 y IDx2 son las concentraciones que producen el mismo efecto cuando se administran solas. Por ejemplo, para el punto S (Figura 13) sería:

$$CI = \frac{0.1}{1.37} + \frac{0.1}{0.55}$$

10

El valor del CI (índice combinación) es 0,407. Según Chou y Talalay (1983), el CI puede tener valores entre 0 y 1 para la sinergia.

Así, se espera el efecto sinérgico en la mezcla entre el aceite de *Ocimum basilicum* y el monoterpeno Carvacrol, alcanzando eficacias elevadas en función de la mortalidad por contacto.

15

Ejemplo 6: Composición biopesticida contra ácaros

En algunas realizaciones de la presente invención, se llevaron a cabo varios ensayos de campo para la composición obtenida en el proceso de fabricación del ejemplo 3 para probar la actividad biopesticida.

20

Composición biopesticida contra el ácaro *Tetranychus urticae* en tomateras de invernadero (*Lycopersicon esculentum*)

25 Dado que la composición del ejemplo 5.1 se probó para determinar la selectividad y eficacia contra el ácaro *Tetranychus urticae* en tomateras de invernadero. El producto se comparó con un control negativo (plantas no tratadas) y un control positivo a base de bifenazato, tal y como muestra la **Tabla 14**.

25

30 Se realizó un diseño aleatorio de bloques completos con 4 réplicas por tratamiento. Las parcelas elementales fueron de 12 m² con 12 plantas por parcela. Se realizaron dos pulverizaciones foliares (códigos de aplicación A y B mostrados en **Tabla 14**) con una mochila pulverizadora (Maruyama) con 400 kPa de presión y 600 l/ha de volumen de agua para la primera aplicación, y 750 l/ha para la segunda. La primera aplicación se
35 realizó al detectar la primera presencia de la plaga, y la segunda 7 días después.

30

35

Sobre 25 folíolos por parcela con un estado de desarrollo parecido, se realizaron 6 evaluaciones de la aplicación A: antes de la aplicación, a los 3 días de la aplicación (3 DDA) y a los 7 días de la aplicación (7 DDA). Y para la aplicación B: a los 3 días de la aplicación (3 DA-B), a los 7 días de la aplicación (7 DA-B) y a los 14 días de la aplicación (14 DA-B). Esta evaluación está diseñada para probar el número de ácaros adultos vivos, el número de ninfas, el número de huevos y el número de formas móviles (ninfas adultas) por folíolo. La eficacia se expresa con la fórmula de Abbott dada la uniformidad de la plaga al inicio del ensayo.

Tabla 14. Solicitudes de combinaciones probadas contra ácaros adultos de *Tetranychus urticae*

Tratamiento	Tasa	Código de aplicación	Reducción del número de ácaros adultos vivos por folíolo				
			3 DA-A	7 DA-A	3 DA-B	7 DA-B	14DA-B
Control negativo			0 %	0 %	0 %	0 %	0 %
Composición	1,5 ml/l	AB	53 %	80 %	85 %	96 %	87 %
Composición	3 ml/l	AB	71 %	91 %	97 %	100 %	100 %
Composición	6 ml/l	AB	81 %	95 %	99 %	100 %	98 %
Control positivo	0,2 l/ha	AB	83 %	96 %	98 %	100 %	92 %

Como resultado, la **Tabla 14** muestra diferencias estadísticamente relevantes observadas entre las parcelas tratadas y las no tratadas desde la aplicación a los 3 DA-A hasta el final del ensayo (14 DA-B). Asimismo, se observaron diferencias entre las parcelas tratadas a los 3 DA-A, 7 DA-A y 3 DA-B. Aplicada a 6 ml/l, la composición biopesticida de la presente invención obtuvo eficacias entre un 81 % y un 100 % superiores a la aplicada a 3 ml/l (71-100 %), superiores a la aplicada a 1,5 ml/l (53-96 %) y parecidas al control positivo.

Tabla 15 Solicitudes de combinaciones probadas contra ninfas de *Tetranychus urticae*

Tratamiento	Tasa	Código de aplicación	Reducción del número de ninfas vivas por folíolo
-------------	------	----------------------	--

			3 DA-A	7 DA-A	3 DA-B	7 DA-B	14DA-B
Control negativo			0 %	0 %	0 %	0 %	0 %
Composición	1,5 ml/l	AB	47 %	65 %	79 %	84 %	70 %
Composición	3 ml/l	AB	64 %	75 %	92 %	88 %	82 %
Composición	6 ml/l	AB	80 %	85 %	97 %	94 %	89 %
Control positivo	0,2 l/ha	AB	86 %	88 %	92 %	91 %	80 %

En cuanto al número de ninfas por folíolo (**Tabla 15**), se realizó un test de Newman-Keuls al 5 %, que permitió observar diferencias estadísticamente relevantes entre las parcelas tratadas y las no tratadas desde los 3 DA-A hasta el final del ensayo. También se observaron diferencias entre las parcelas tratadas a los 3 DA-A, a los 7 DA-A y a los 3 DA-B.

Una realización de la presente invención muestra una respuesta a la dosis efectiva, la composición biopesticida aplicada a 6 ml/l obtuvo eficacias entre el 80 y el 97 % mayores que la aplicada a 3 ml/l (64-92 %), mayores que la aplicada a 1,5 ml/l (47-84 %) y similares al control positivo.

Tabla 16 Solicitudes de combinaciones probadas contra huevos de *Tetranychus urticae*

Tratamiento	Tasa	Código de aplicación	Reducción del número de huevos vivos por folíolo				
			3 DA-A	7 DA-A	3 DA-B	7 DA-B	14DA-B
Control negativo			0 %	0 %	0 %	0 %	0 %
Composición	1,5 ml/l	AB	30 %	54 %	63 %	81 %	76 %
Composición	3 ml/l	AB	50 %	73 %	86 %	89 %	85 %
Composición	6 ml/l	AB	76 %	85 %	90 %	92 %	92 %
Control positivo	0,2 l/ha	AB	84 %	89 %	95 %	83 %	81 %

En cuanto al número de huevos por folíolo, en la **Tabla 16** se pueden observar diferencias estadísticamente relevantes entre las parcelas tratadas y las no tratadas desde los 3 DA-A hasta el final del ensayo (14 DA-B). También se observaron diferencias estadísticamente relevantes entre las parcelas tratadas.

Los resultados son similares a las pruebas anteriores, en adultos y ninfas, el número de huevos disminuye más si la composición biopesticida es mayor. Del mismo modo, los resultados son comparables al control positivo.

Composición biopesticida contra el ácaro *Panonychus citri*

Dado que la composición del ejemplo 5.1 mató eficazmente el ácaro *Panonychus citri*. Utilizando 4cc de la prueba de composición (concentraciones mostradas en la **Tabla 18**) se aplicó en material vegetal (rama de naranjo cada una con 3 hojas) con *Panonychus citri* utilizando una torre Potter asistida por aire. Además de control negativo (sin tratamiento) y control positivo (con espiroclorfenol). Una vez secas las hojas tratadas, se depositaron en tubos de plástico etiquetados, con agua para evitar la deshidratación.

Figura 14.

Tabla 18. Tratamiento

Tratamiento	Concentración
A	2,0 ml/l
B	3,0 ml/l
C	4,0 ml/l
Control positivo	0,6 ml/l
Control negativo	-

La composición de eficacia se evaluó utilizando parámetros de movilidad por ácaros. Los resultados se evaluaron con un análisis de covarianza porque los resultados anteriores controlaban estadísticamente los efectos de otras variables continuas que no son de interés principal. En este caso, para encontrar medias que sean significativamente distintas entre sí, se utilizó la prueba de Tukey ($p \leq 0,05$).

Los resultados se muestran en la siguiente tabla:

Tabla 19. Resultados del ensayo

Tratamiento	Movilidad del ácaro <i>Panonychus citri</i> por hoja después de días de aplicación		
	Aplicación previa	1.º día	4.º día
A	23,7	17,5	9,5
B	17,2	12,6	7,7
C	12,3	8,7	5,4
Control positivo	14,0	10,0	6,2
Control negativo	17,0	17,0	19,3

Se llegó a la conclusión de que la composición, ejemplo 5.1 en distintas concentraciones (2, 3 y 4ml/l), fue eficiente para el control del ácaro *Panonuchis citri* si la comparamos con el control positivo después de 4 días de aplicación. Además, la composición mostró una eficacia parecida a la del control positivo en concentraciones más bajas. **Figura 15.**

Composición biopesticida contra el ácaro *Brevipalpus chilensis*

Dado que la composición del ejemplo 5.1 mató eficazmente el ácaro *Brevipalpus chilensis*. Utilizando 2cc de la prueba de composición (concentraciones mostradas en la **Tabla 18**) se aplicó en material vegetal con *Brevipalpus chilensis* utilizando una torre Potter asistida por aire. Además de un control negativo (sin tratamiento) y un control positivo (con espiroclorfenol). Una vez secas las hojas tratadas, se depositaron en tubos de cristal etiquetados, con agua para evitar la deshidratación. **Figura 16.**

La composición de eficacia se evaluó utilizando parámetros de movilidad por ácaros. Los resultados se evaluaron con un análisis de covarianza porque los resultados anteriores controlaban estadísticamente los efectos de otras variables continuas que no son de interés principal. En este caso, para encontrar medias que sean significativamente distintas entre sí, se utilizó la prueba de Tukey ($p \leq 0,05$).

Los resultados se muestran en la siguiente tabla:

Tabla 20. Resultados del ensayo

Tratamiento	Movilidad del ácaro <i>Brevipalpus chilensis</i> por hoja después de días de aplicación		
	Aplicación previa	1.º día	4.º día
A	20,0	15,6	11,2
B	14,8	10,2	4,8
C	19,2	18,4	4,2
Control positivo	24,8	22,6	6,0
Control negativo	27,6	33,6	23,6

Se llegó a la conclusión de que la composición, ejemplo 5.1 en distintas concentraciones (2, 3 y 4ml/l), fue eficiente para el control del ácaro *Brevipalpus chilensis* si la comparamos con el control positivo después de 4 días de aplicación. Además, la composición mostró una eficacia parecida a la del control positivo en adultos.

Composición biopesticida contra el ácaro *Oligonychus yothersi*

Dado que la composición del ejemplo 5.1 mató eficazmente el ácaro *Oligonychus yothersi*. Utilizando 4cc de la prueba de composición (concentraciones mostradas en la **Tabla 18**) se aplicó en cada hoja de *Persea americana* infestada con *Oligonychus yothersi* utilizando una torre Potter asistida por aire. Además de un control negativo (sin tratamiento) y un control positivo (con espiroclorfenol). Una vez secas las hojas

tratadas, se depositaron en tubos de plástico etiquetados, con agua para evitar la deshidratación. **Figura 17.**

La composición de eficacia se evaluó utilizando parámetros de movilidad por ácaros.

5 Los resultados se evaluaron con un análisis de covarianza porque los resultados anteriores controlaban estadísticamente los efectos de otras variables continuas que no son de interés principal. En este caso, para encontrar medias que sean significativamente distintas entre sí, se utilizó la prueba de Tukey ($p \leq 0.05$).

10 Los resultados se muestran en la siguiente tabla:

Tabla 21. Resultados del ensayo

Tratamiento	Movilidad del ácaro <i>Oligonychus yothersi</i> después de días de aplicación		
	Aplicación previa	1. ^{er} día	4. ^o día
A	34,4	20,6	10,2
B	57,4	30,4	16,8
C	57,4	31,6	16,6
Control positivo	37,6	23,0	11,2
Control negativo	52,6	56,6	62,2

Se llegó a la conclusión de que la composición, ejemplo 5.1 en distintas concentraciones (2, 3 y 4ml/l), fue eficiente para el control del ácaro *Oligonychus yothersi* si la comparamos con el control positivo en entorno de laboratorio.

15

Referencias

Esta lista de referencias citadas por el solicitante es únicamente para facilidad del lector. No forma parte del documento de patente europea. Aunque las referencias se han
5 recogido con gran atención, podrían contener errores u omisiones y la EPO queda eximida de cualquier responsabilidad en este sentido.

Documentos de patente citados en la descripción

- 10 • EP0869714 A (VITA (EUROPA)) 12.06.1997.

Literatura no patentada citada en la descripción

- 15 • Meck, E.D., Walgenbach, J.F., Kennedy, G.G. Effect of vegetation management on autumn dispersal of *Tetranychus urticae* (Acari: *Tetranychidae*) from tomato. J. Appl. Entomol. 2009 133, p. 742-748.
- 20 • Wyman, J.A., Oatman, E.R., Voth, V. Effects of varying twospotted spider mite infestation levels on strawberry yield. J. Econ. Entomol. 1979. 72, p.747e753.
- Walsh, D.B., Zalom, F.G., Shaw, D.V. Interaction of the twospotted spider mite (Acari: *Tetranychidae*) with yield of day-neutral strawberries in California. J. Econ. Entomol. 1998. 91, p.678-685.
- 25 • Park, Y.-L., Lee, J.-H. Impact of twospotted spider mite (Acari: *Tetranychidae*) on growth and productivity of glasshouse cucumbers. J. Econ. Entomol. 2005 98, p.457-463.
- Padilha, g.; Fiorin, r.a.; Filho, a.c.; Pozebon, h.; Rogers, j.; Marques, r.p.; Castilhos, l.b.; Donatti, a.; Stefanelo, l.; Burtet, l.m.; Stacke, r.f.; Guedes, j.v.c.; Arnemann, j.a . Damage assessment and economic injury level of the two-spotted spider mite *Tetranychus urticae* in soybean. Pesquisa Agropecuária Brasileira, 2020 v.55, p.01836.
- 30 • Badawy, et al. Acaricidal and quantitative structure activity relationship of monoterpenes against the two-spotted spider mite, *Tetranychus urticae* Exp Appl Acarol. 2010, no.52, p.261-274.
- Camilo et al. Acaricidal activity of essential oils. Trends Phytochem. Res. 1(4) 2017 183-198.
- 35 • S.A.M. Abdelgaleil, M.E.I. Badawy, N.F. Mahmoud, et al Acaricidal activity, biochemical effects and molecular docking of some monoterpenes against two-

spotted spider mite *Tetranychus urticae* Koch. Pesticide Biochemistry and Physiology. 2019.

- Asmae Bakkali Aissaoui, Said Zantar y Amal Elamrani. Chemical composition and potential acaricide of *Salvia officinalis* and *Eucalyptus globulus* on *Tetranychus urticae* Koch (Acarina: *Tetranychidae*). J. of App. Chem. y Env. Prot., 2019, 4(1), p. 1-15.
- Arvind Saroj, et al. Natural Remedies for Pest, Disease and Weed Control || Phytochemicals of Plant-Derived Essential Oils. Elsevier Inc., 2020. p.65-79.
- Lamy, et al. Artificially applied plant volatile organic compounds modify the behavior of a pest with no adverse effect on its natural enemies in the field. J Pest Sci. 06/07/2016.
- Banji Adaramola y Adebayo Onigbinde. Influence of extraction technique on the mineral content and antioxidant capacity of edible oil extracted from ginger rhizome. Chemistry International 2017 3(1) 1.
- Qing-Wen Zhang, Li-Gen Lin y Wen-Cai Ye. Techniques for extraction and isolation of natural products: a comprehensive review. Chinese Medicine 2018 13:20
- Limpel, L. E.; Schuldt, P. H.; Lamont, D. Weed control by dimethyl tetrachloroterephthalate alone and in certain combinations. Proc. North. Weed Control Conf., v. 16, p. 48-53, 1962.
- Ting-Chao Chou; Paul Talalay . Analysis of combined drug effects: a new look at a very old problem. Trends in Pharmacological Sciences. Volumen 4, 1983, Páginas 450-454
- Hugo Alfonso Rojas-Sarmiento. Hidrogenación selectiva de citral en fase líquida sobre catalizadores Ir-Fe/TiO₂ reducidos a alta temperatura. Revista colombiana de química, volumen 34, no. 2 de 2005.
- John C. Wickham, Peter R. Chadwick y Duncan C. Stewart. Factors which Influence the Knockdown Effect of Insecticide Products. Pestic. Sci. 1974, 5, 657-664.
- Essam Enan. Insecticidal activity of essential oils: octopaminergic sites of action. Comparative Biochemistry and Physiology Part C 130 2001 325 -337.
- Milena Jankowska, Justyna Rogalska, Joanna Wyszowska y Maria Stankiewicz. Molecular Targets for Components of Essential Oils in the Insect Nervous System—A Review. Molecules 2018, 23, 34.

- Hyun Sik Roh, Eu Gene Lim, Jinwoo Kim y Chung Gyoo Park. Acaricidal and oviposition deterring effects of santalol identified in sandalwood oil against two-spotted spider mite, *Tetranychus urticae* Koch (Acari: Tetranychidae) J Pest Sci (2011) 84:495–501.
- 5 • Abd El-moneim Mrafifyafatma Salibafturkya. Control of *Tetranychus urticae* Koch by extracts of three essential oils of chamomile, marjoram and Eucalyptus. Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine volumen 2, edición 1, enero 2012, páginas 24-30.
- 10 • Sebe Brown, David L.Kerns, Jeffrey Gore, Gus Lorenz y Scott Stewart. Susceptibility of twospotted spider mites (*Tetranychus urticae*) to abamectin in Midsouth cotton. Crop Protection Volumen 98, agosto 2017, páginas 179-183.
- Liliana Ruiz-Vásquez , Matías Reina, Víctor Fajardo, Matías López y Azucena González-Coloma. Insect Antifeedant Components of *Senecio fistulosus* var. *fistulosus*—Hualtata. Plants 2019, 8(6), 176.
- 15 • Ricardo A. Rincón, Daniel Rodríguez y Ericsson Coy-Barrera. Botanicals Against *Tetranychus urticae* Koch Under Laboratory Conditions: A Survey of Alternatives for Controlling Pest Mites. Plants 2019, 8(8), 272.
- Murray Isman. Insect antifeedants. Pesticide Outlook, 2002 13(4), 152-157
- E. M. Williamson. Synergy and other interactions in phytomedicines. 20 Phytomedicine 2001, Vol. 8(5), páginas 401–409
- Chas. F. Henderson y Elvin W. Tilton. Tests with Acaricides against the Brown Wheat Mite. Journal of economic entomology. Vol. 48, No.2 P.157-161

25

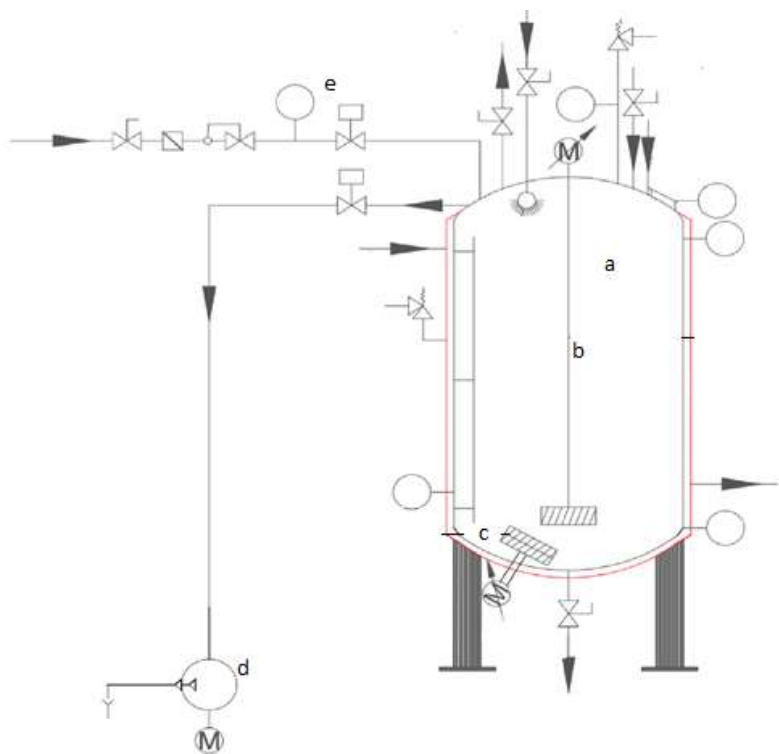


Fig. 1

5

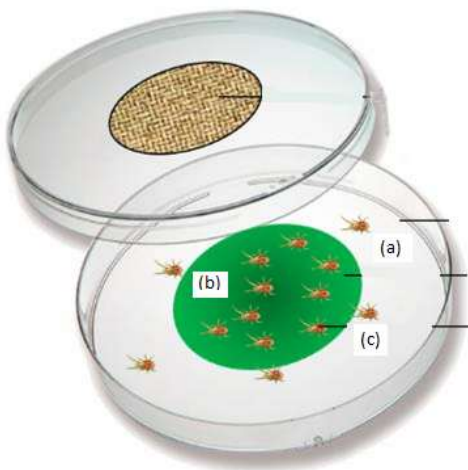


Fig. 2

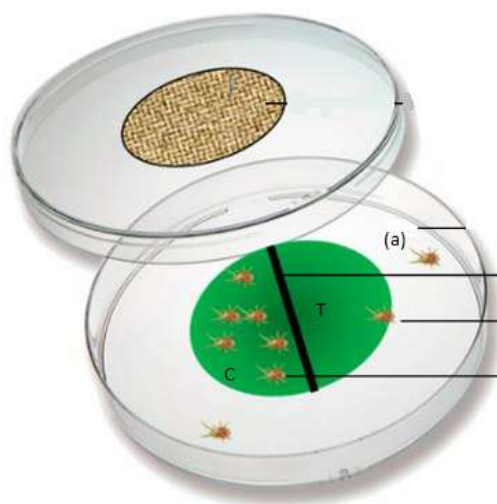


Fig. 3



Fig. 4

5

10



Fig. 5

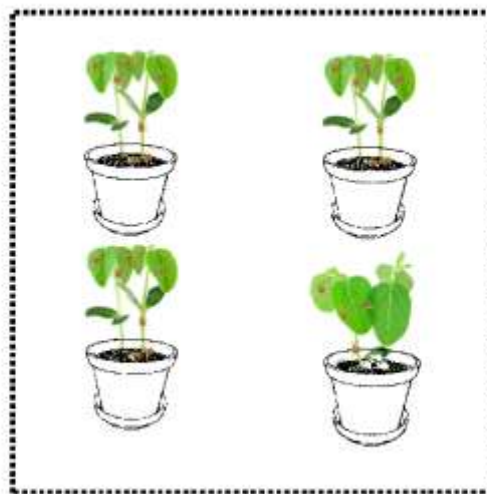


Fig. 6

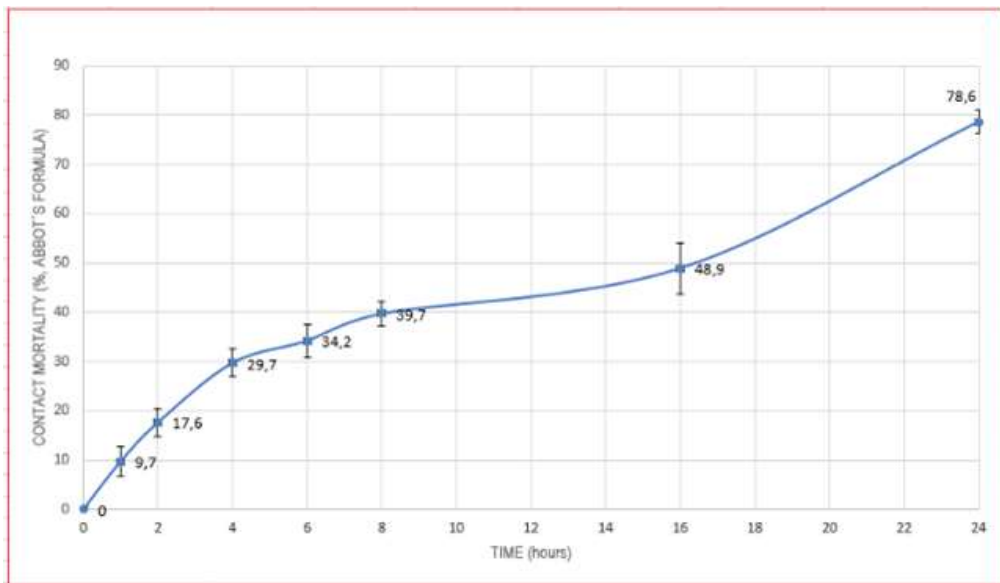


Fig. 7

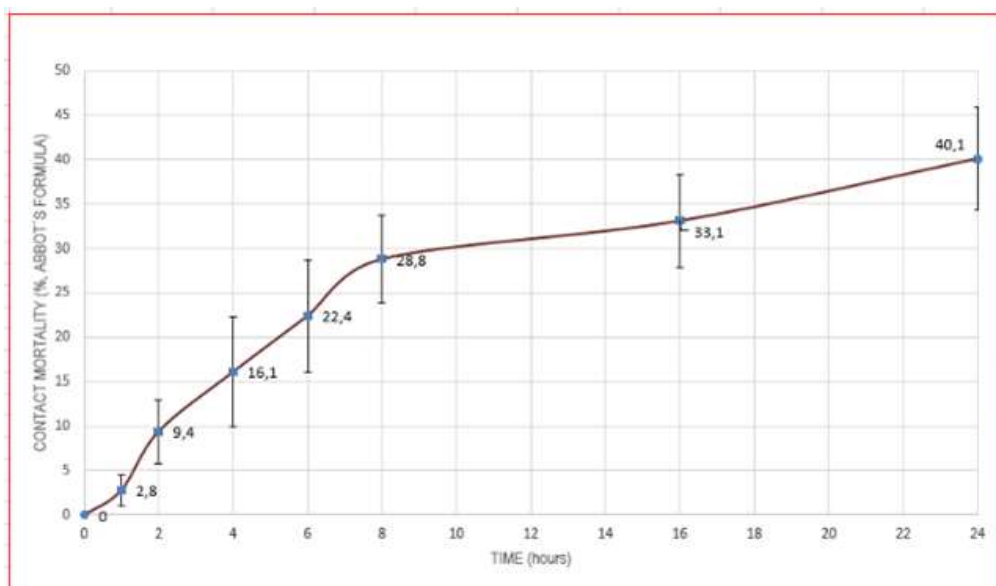


Fig. 8

5

10

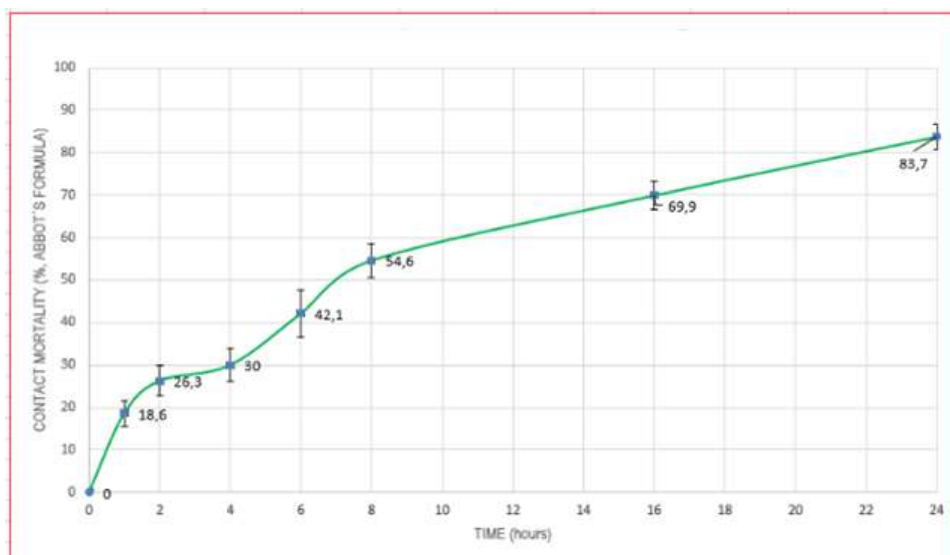


Fig. 9

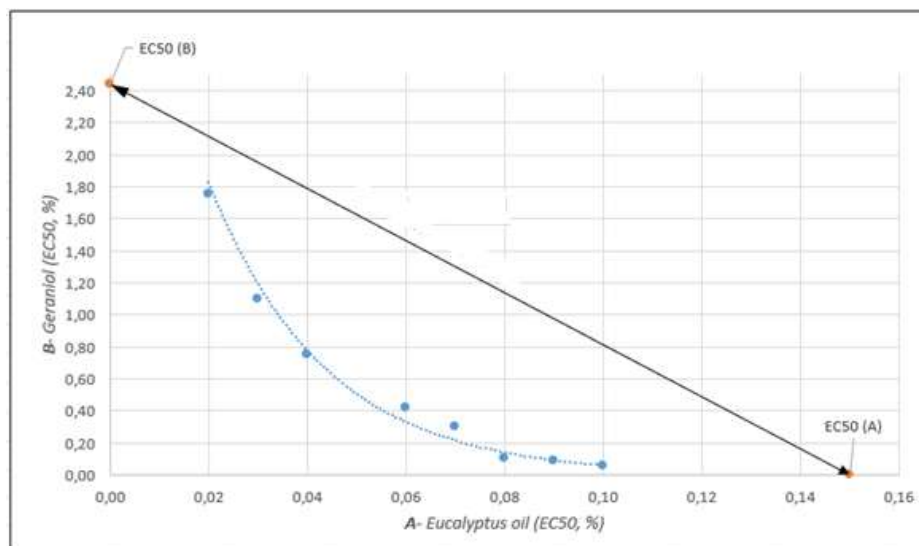


Fig. 10

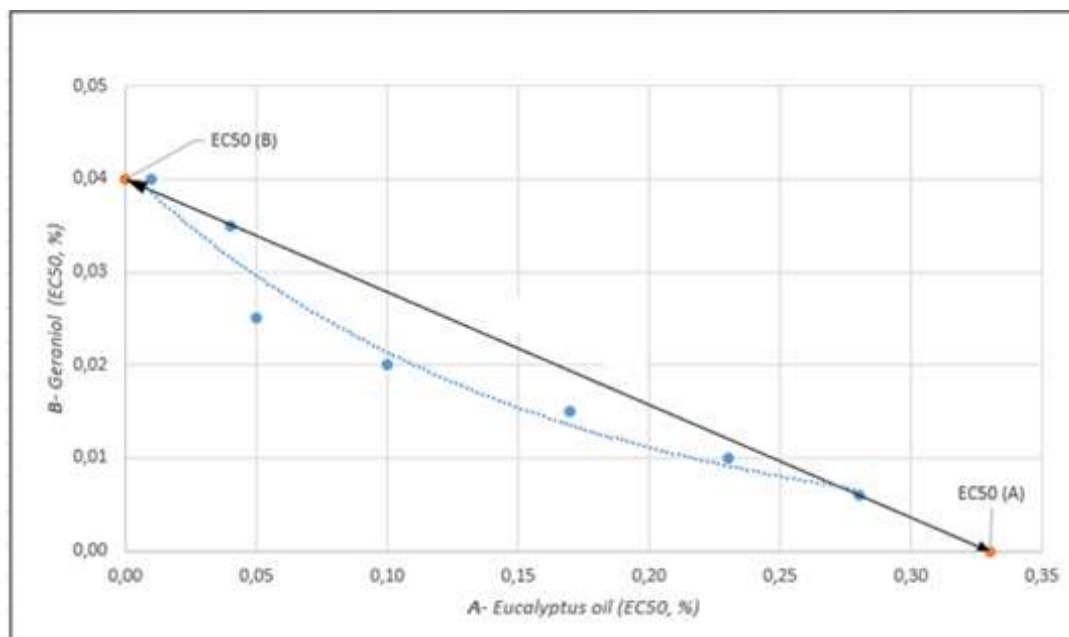


Fig. 11

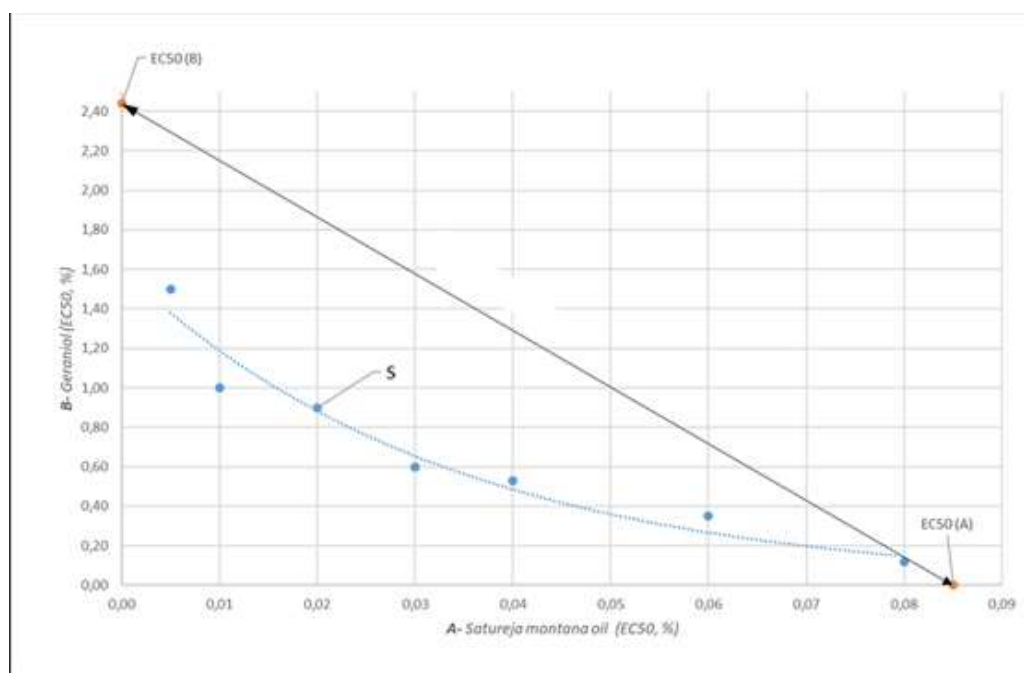


Fig. 12

5

10

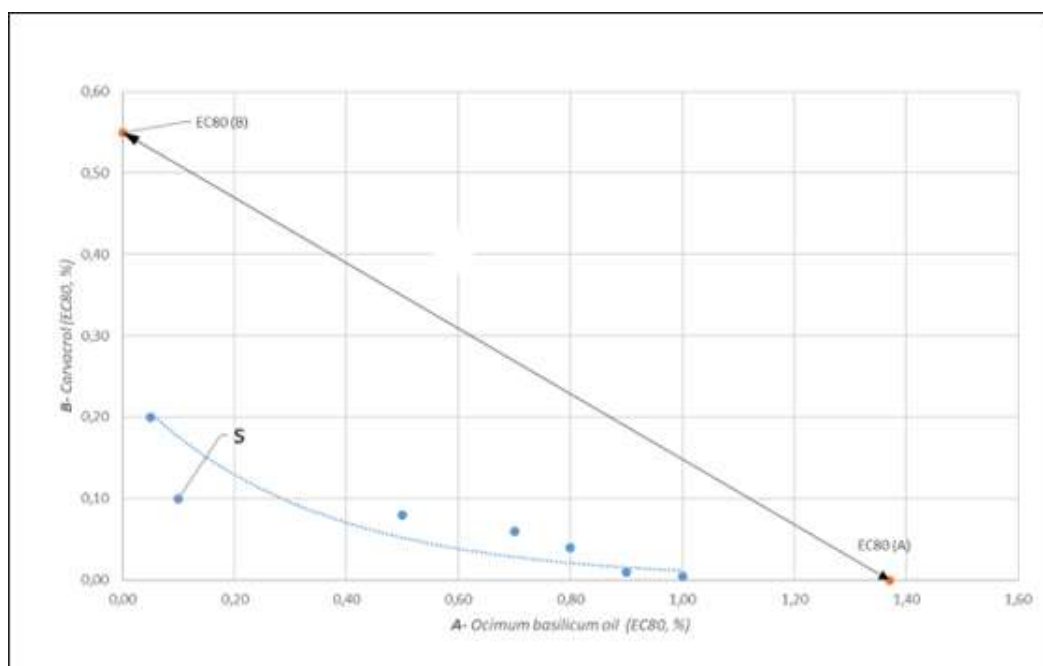


Fig. 13

5



Fig. 14

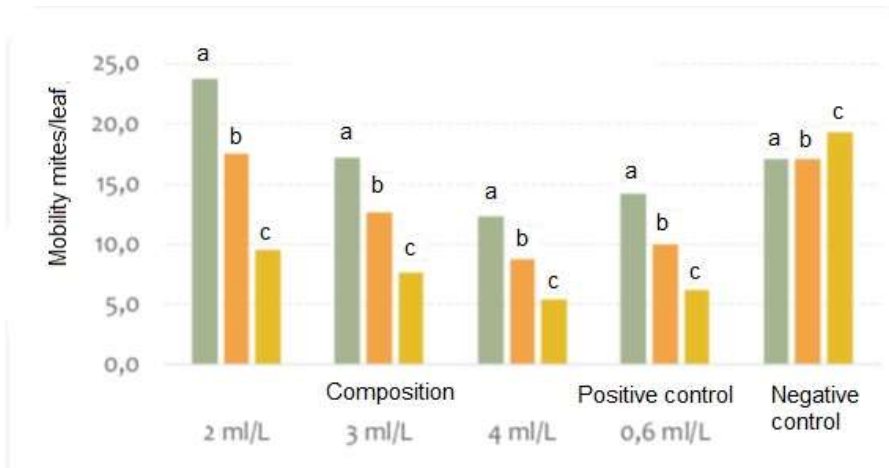


Fig. 15



Fig. 16

5

10



Fig.17