(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 761 076**

(21) Número de solicitud: 201831106

(51) Int. CI.:

A01N 33/04 (2006.01)

(12) SOLICITUD DE PATENTE A1

(22) Fecha de presentación:

15.11.2018

(43) Fecha de publicación de la solicitud:

18.05.2020

(71) Solicitantes:

UNIVERSIDAD DE VALLADOLID (100.0%)
Ctt-Otri-Casa del Estudiante, C/ Real de Burgos, s/n
47001 VALLADOLID ES

(72) Inventor/es:

MATEI PETRUTA, Micaela;
MARTÍN GIL, Jesús;
MATÍN RAMOS, Pablo;
ANDRÉS JUAN, Celia y
PÉREZ LEBEÑA, Eduardo

(74) Agente/Representante:

UNGRÍA LÓPEZ, Javier

(54) Título: **COMPLEJO CONJUGADO PARA EL TRATAMIENTO DE AGENTES PATÓGENOS PRESENTES EN LA AGRICULTURA Y LA NATURALEZA**

(57) Resumen:

Complejo conjugado para el tratamiento de agentes patógenos presentes en la agricultura y la naturaleza. Un complejo conjugado que comprende: i) épsilon-polilisina (EPL), ii) un aminoglucósico (AM) de peso molecular igual o inferior a 2000 g/mol y iii) al menos un compuesto con actividad antimicrobiana (CAM). Así como un método para obtener este complejo conjugado utilizando ultrasonidos; y el uso de los complejos para el tratamiento de microbios patógenos presentes en la naturaleza y/o agricultura.

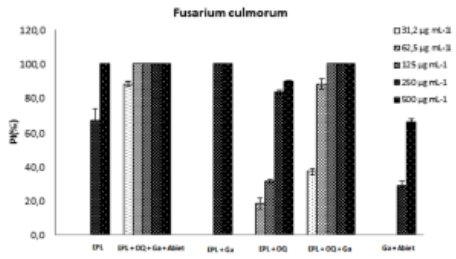


Fig. 1

ES 2 761 076 A1

DESCRIPCIÓN

COMPLEJO CONJUGADO PARA EL TRATAMIENTO DE AGENTES PATÓGENOS PRESENTES EN LA AGRICULTURA Y LA NATURALEZA

SECTOR TÉCNICO

La presente invención se encuadra en el ámbito de la química orgánica y halla su aplicación en el sector fitosanitario. De forma más específica, proporciona un nuevo complejo conjugado que permite tratar los efectos causados por agentes patógenos (tal como hongos y bacterias) en la agricultura y, en general, en la Naturaleza. El complejo de la presente invención presenta una actividad mayor que la obtenida de utilizarse los componentes por separado. Adicionalmente, el complejo que aquí se describe proporciona solubilidad en agua a compuestos antimicrobianos que no son hidrosolubles, preferentemente ácidos polifenólicos y terpénicos como ácido gálico y ácido abiético, lo que aumenta considerablemente su biodisponibilidad y, en consecuencia, su actividad antimicrobiana.

ESTADO DE LA TÉCNICA

La mayoría de los hongos son saprobios y no patógenos de plantas, animales y humanos. Sin embargo, un número relativamente pequeño de especies fúngicas son fitopatógenas, causan enfermedad humana (por ejemplo, infecciones, alergias) y producen toxinas que afectan a plantas, animales y humanos. Entre los hongos patógenos están los miembros de los géneros *Aspergillus* y *Fusarium,* junto con otros géneros (por ejemplo, *Alternaria*, *Mucor*) que son denominados “patógenos fúngicos emergentes”. Estos hongos representan una amenaza común tanto para la producción agrícola como para la salud de las personas sanas o inmunodeficientes. En conjunto, estos hongos pueden causar enormes pérdidas económicas en la agricultura, pérdidas alimenticias por deterioro, y enfermedades humanas y animales graves, a menudo fatales.

Otro agente patógeno que produce grandes pérdidas en la agricultura es una bacteria Gramnegativa denominada *Xylella fastidiosa*. Es una bacteria fitopatógena, de la clase proteobacteria, con gran potencial de daño económico. Ataca sin curación en la actualidad a diversas plantas de utilidad económica como la vid, el olivo, el almendro, el ciruelo, el melocotón y el limonero así como otros que no producen frutos, como el laurel. Los vectores o agentes transmisores de la enfermedad son insectos que se alimentan del xilema de las

plantas. Una vez que el vector pique y chupe en una planta infectada, adquiere la bacteria que permanece en las estructuras de alimentación del insecto y lo transmitirá a la siguiente planta que pique para nutrirse.

La *Xylella fastidiosa* es originaria del norte de California, donde se descubrió hacia final del Siglo XIX, hasta la fecha no existe ningún antídoto que sea eficaz. En 1889, el Departamento de Agricultura de EE. UU. (USDA) encargó al patólogo y botánico Newton B. Pierce que investigara la enfermedad de las vides del valle de Santa Ana, hoy condado de Orange. Pierce concluyó el estudio sin encontrar la verdadera causa, y la plaga no volvió a estudiarse durante más de 50 años; si bien conservó el nombre de su estudioso, llamándose la enfermedad de Pierce (Pierce's Disease). Se estima que sólo en la viticultura de California esta plaga causa daños por valor de 104 millones de dólares al año.

Esta bacteria se detectó en el olivar del sur de Italia (Pulla) en 2013 y, desde entonces, la propagación de la plaga en esa plantación ha sido muy veloz. En 2015 había millones de olivos afectados y 230.000 hectáreas afectadas. Adicionalmente, a finales de 2016 se detectó la bacteria en las Islas Baleares (España). A final de junio de 2017 se hizo pública la detección por primera vez en la península ibérica, en Guadalest (Alicante) encontrándose la bacteria en almendros. En abril del 2018 se ha detectado por primera vez en olivos en Villarejo (Madrid).

Otro agente patógeno que está provocando grandes pérdidas materiales es la *Phytophthora cinnamomi*, causante de la enfermedad denominada podredumbre radical de la encinas y que afecta también a los castaños.

En el estado de la técnica se ha descrito la utilización de polifenoles tal como el ácido gálico para el tratamiento frente a hongos. En particular, la capacidad antifúngica del ácido gálico se ha estudiado en “Antifungal Activity of Gallic Acid In Vitro and In Vivo”, Phytother Res. 2017 Jul; 31, donde se destaca que este polifenol redujo la actividad de la 14α-desmetilasa de esterol P450 (CYP51) y el escualeno epoxidasa en la membrana de los hongos estudiados.

Por otra parte, el ácido abiético es un diterpeno con un ácido carboxílico, que se puede extraer de la resina de los pinos y de las coníferas en general. El ácido abiético ha mostrado propiedades de fitoalexina (Phytoalexin-like Activity of Abietic Acid and Its Derivatives”, *J.*

Agric. Food Chem., 1995), lo cual implica su contribución en la protección de los árboles en contra del ataque por hongos. Este compuesto es insoluble en agua.

Sin embargo, la mayoría de compuestos polifenólicos y terpénicos, así como muchos otros compuestos con actividad antimicrobiana, no son hidrosolubles. En consecuencia, su utilización en el tratamiento frente agentes patógenos en la agricultura y la naturaleza no resulta suficientemente efectiva. Por lo tanto, existe una necesidad de desarrollar un nuevo producto que permita solubilizar una gran variedad de compuestos antimicrobianos y, así proporcionarles una actividad suficiente para que su utilización para tratar los efectos causados por agentes patógenos, tal como hongos y bacterias, en la agricultura y, en general, en la Naturaleza sea efectiva.

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCIÓN

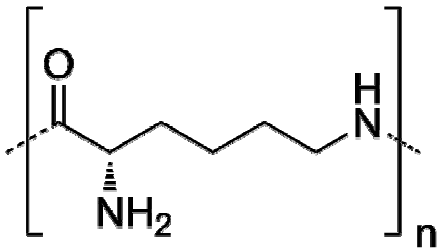
La presente invención proporciona un complejo conjugado que comprende: i) épsilon-polilisina (EPL), ii) un aminoglucósico (AM) de peso molecular igual o inferior a 2000 g/mol y iii) al menos un compuesto con actividad antimicrobiana (CAM), en particular, un compuesto antimicrobiano no hidrosoluble.

Se prefiere que el compuesto antimicrobiano (CAM) sea un compuesto no hidrosoluble, ya que así las ventajas que proporciona el complejo de la invención, respecto a la utilización de dicho compuesto de forma aislada, son significativamente mayores al permitir el complejo conjugado que aquí se describe la solubilización del compuesto antimicrobiano en medios acuosos.

En particular, el complejo conjugado de la presente invención está formado por una matriz polimérica formada por épsilon-polilisina (EPL) y el aminoglucósido (AM) de peso molecular igual o inferior a 2000 g/mol, donde se inserta el compuesto antimicrobiano (CAM) mediante la interacción de al menos un grupo funcional de dicha matriz EPL-AM y el compuesto antimicrobiano. De forma más específica, el compuesto antimicrobiano tiene capacidad de formar una sal iónica con el complejo formado por EPL y AM.

La épsilon-poli-L-lisina (EPL) es un péptido catiónico antimicrobiano natural, considerado como seguro (GRAS) y que se utiliza actualmente como conservante de alimentos. Su actividad antimicrobiana está bien documentada y su mecanismo de acción es conocido. Se postula que la ε-PL desestabiliza las membranas de los agentes patógenos, mediante la

interacción con grupos de fosfolípidos cargados negativamente, que desplazan cationes divalentes y que conduce a la formación de vesículas/micelas en las membranas, produciendo su deformación y rotura.



Estructura molecular de la EPL

Es de destacar que el efecto antimicrobiano de la EPL viene determinado por la cantidad de grupos carboxamida presentes en el polímero y por los grupos amino, que tienen una gran influencia en el tratamiento de bacterias Gramnegativas.

En el estado de la técnica (CN104621680 A, UNIV QILU TECHNOLOGY); Liang Chunxuan y col., “Structure and antimicrobial mechanism of epsilon-polylysine-chitosan conjugates through Maillard reaction”. International Journal of Biological Macromolecules. Septiembre 2014, Vol. 70, páginas 427-434; Wang Yingying y col., “Effect of Maillard reaction products on the physical and antimicrobial properties of edible films based on epsilon-polylysine and chitosan”. Journal of the Science of Food and Agriculture. Nov 2014, Vol. 94, páginas 2986-2991) se han descrito compuestos formado por combinación de épsilon-poli-lisina y quitosano, así como su utilización en la conservación de alimentos. Sin embargo, hasta el momento no se conocía que los oligómeros de quitosano, en particular con un peso molecular igual o inferior a 2000 g/mol podían dar lugar a una matriz EPL-AM, capaz de interaccionar con un compuesto con actividad antimicrobiana (CAM) para formar el complejo conjugado de la presente invención. Las propiedades de un polímero pueden variar significativamente en función del peso molecular de dicho polímero. Así, generalmente, no se puede extrapolar el comportamiento de un oligómero a partir del comportamiento mostrado por polímeros, de peso molecular muy superior.

En realizaciones particulares de la invención, el aminoglucósido (AM) de peso molecular igual o inferior a 2000 g/mol se selecciona del grupo que consiste en oligómero de quitosano, glucosamina (peso molecular 179 g/mol) y una combinación de los anteriores. Preferentemente, el oligómero de quitosano tiene un peso molecular de entre 1000 a 2000

g/mol. La utilización de un oligómero de quitosano con el peso molecular indicado anteriormente evita la formación de geles en solución, ya que al reducirse el peso se aumenta la solubilidad del oligómero de quitosano en agua, facilitando la formación de la matriz EPL-AM.

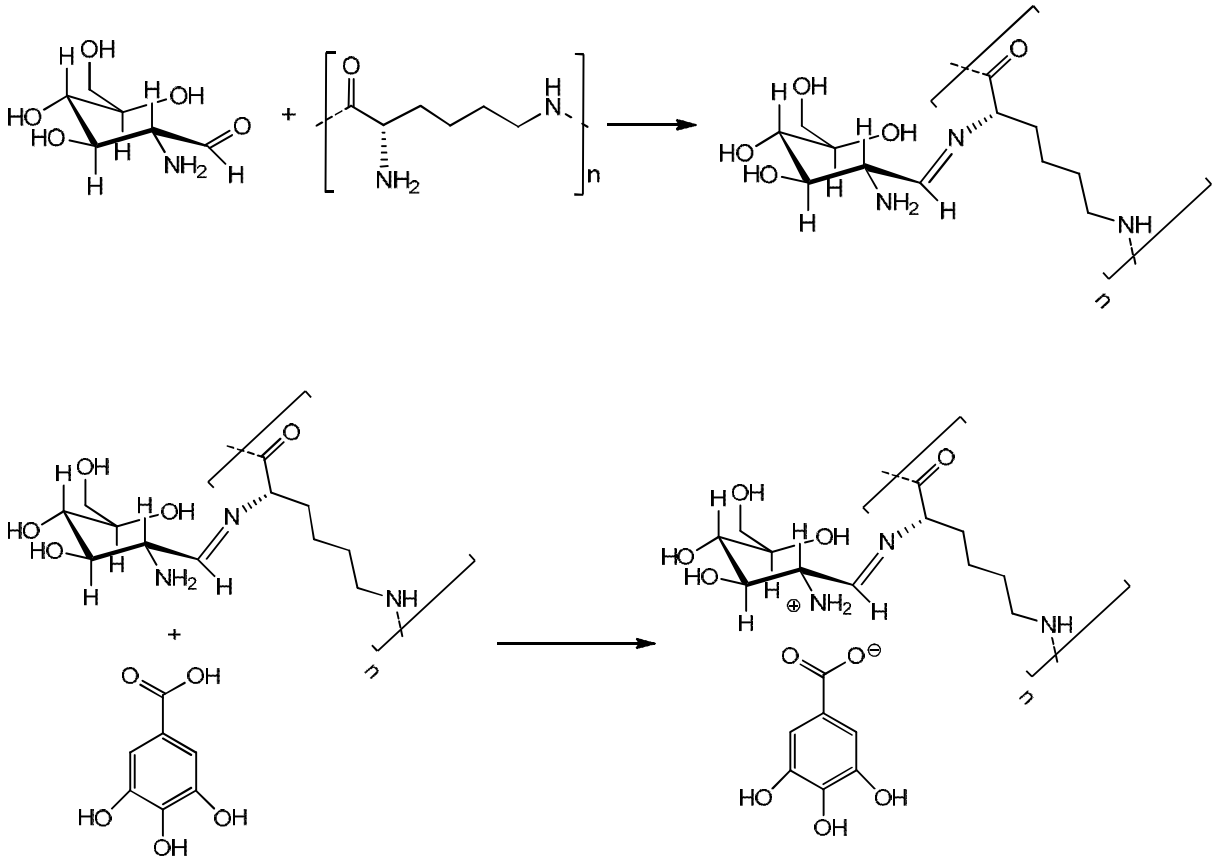
Los aminoglucósidos también presentan actividad antimicrobiana. En particular, el oligómero de quitosano se compone de una mezcla de glucosaminas, quitodiosas, quitotriosas y quitotetraosas, con una actividad antimicrobiana. En concreto la quitotriosa tiene una estructura molecular muy similar a la kanamicina, medicamento usado desde hace décadas para el tratamiento de bacterias Gramnegativas.

Adicionalmente, estos aminoglucósidos tienen un conocido efecto fitoprotector en las plantas. Se sabe que cuando las plantas son infectadas por un hongo, sintetizan una enzima llamada quitinasa, que degrada la quitina, principal componente de la pared de las células del hongo. De forma más específica, la presencia de glucosamina en la composición del suelo provoca un aumento de tricomas absorbentes, lo cual da lugar a un aumento del vigor de la planta. La primera reacción que se observa es un fortalecimiento de los ápices que toman un color verde intenso, con el borde de las hojas ligeramente rizado. Es debido a que la glucosamina induce en la planta una respuesta semejante a la que daría lugar si intentara defenderse de un ataque por hongos, nemátodos o insectos, lo cual da lugar al aumento de vigor. No se produce un crecimiento excesivo, como puede ocurrir con aporte de aminoácidos o abonos nitrogenados.

Un aspecto importante de la presente invención es la formación de complejos conjugados entre épsilon-polilisina y aminoglucósidos (EPL-AM) de peso molecular igual o inferior a 2000 g/mol, ambos compuestos hidrosolubles y con actividad antimicrobiana. Los compuestos antimicrobianos (CAM) comprendidos en el complejo de la invención, preferentemente ácidos polifenólicos y terpénicos, tal como ácido gálico y ácido abiético, tienen capacidad de formar sales con el complejo formado por EPL-AM. De esta forma, la presente invención permite aumentar la biodisponibilidad de los compuestos antimicrobianos (CAM) incluidos en el complejo, en particular de aquellos que no son hidrosolubles por separado.

Sin que se considere limitante de la invención, los inventores consideran que el mecanismo de formación del nuevo complejo, donde el compuesto antimicrobiano es un ácido polifenólico o terpénico, puede ocurrir en dos etapas: (1) reacción de la amina del polímero

(EPL) con el grupo aldehído del aminoglucósido dando lugar a la formación de la imina; (2) la amina libre procedente del aminoglucósico reacciona con el grupo ácido carboxílico del ácido polifenólico o terpénico para formar una sal de amonio. A continuación se ilustra el mecanismo propuesto para la formación de un complejo donde el aminoglucósido (AM) es D-Glucosamida, y el compuesto antimicrobiano (CAM) es ácido gálico:



Así, el complejo conjugado que aquí se describe comprende un polímero injertado formado entre polilisina y aminoglucósido (EPL-AM), donde dicho polímero forma una matriz donde se inserta el compuesto antimicrobiano (CAM), en particular ácido polifenólico, ácido terpénico o una combinación de estos.

El complejo conjugado de la presente invención es soluble en agua, ya que el nuevo biomaterial polimérico (obtenido mediante sonicación por ultrasonidos) incorpora los compuestos antimicrobianos en forma de sal iónica. Adicionalmente, este complejo presenta actividad sinérgica, es decir, la MIC (cantidad mínima inhibitoria sobre los agentes patógenos) es menor que la de cada compuesto por separado.

El compuesto antimicrobiano (CAM) puede ser un compuesto antifúngico, un compuesto antibacteriano o una combinación de éstos.

Tal como se ha mencionado anteriormente, el compuesto antimicrobiano comprendido en el complejo conjugado que aquí se describe tiene preferentemente al menos un grupo funcional con capacidad de unirse a la matriz formada por EPL y AM. Este grupo funcional puede ser, por ejemplo, cualquier grupo funcional capaz de formar una sal iónica con alguno de los grupos hidroxilo o, en particular, con el grupo amino del aminoglucósico. Preferentemente, el compuesto antimicrobiano comprende al menos un grupo carboxílico.

En realizaciones preferidas de la invención, el complejo conjugado comprende un ácido polifenólico, un ácido terpénico o una combinación de los anteriores. Así, el compuesto antimicrobiano puede seleccionarse del grupo que consiste en ácido gálico, ácido elágico, galotaninos, elegitaninos, ácido ferúlico, ácido cafeico, ácido rosmarícico, ácido abiético, ácido oleanólico, ácido boswélico y una combinación de los anteriores. De forma aún más preferida, el compuesto antimicrobiano se selecciona del grupo que consiste en ácido gálico, ácido elágico, galotaninos, elegitaninos, ácido abiético y una combinación de los anteriores.

El ácido gálico (también conocido como ácido 3,4,5-trihidroxibenzoico) es un polifenol que se puede encontrar en el cacahuate, zumaque, hamamelis, hojas de té, corteza de roble y otras plantas. El ácido gálico se puede encontrar libre, formando dímeros tal como el ácido elágico, o como parte de taninos hidrolizables, los cuales descomponen en la hidrólisis para dar ácido gálico y glucosa, o ácido elágico y glucosa. Estos taninos hidrolizables son conocidos como galotaninos y elagitaninos, respectivamente.

En realizaciones particularmente preferidas de la presente invención, el complejo conjugado formado épsilon-polilisina (EPL) y aminoglucósido (AM) puede formarse con un exceso de aminoglucósido, preferentemente con una relación molar EPL: AM de (1:1) a (1:2), ambos inclusive, al objeto de incrementar la viscosidad de la solución resultante e incrementar el tamaño de la nanopartícula. De forma aún más preferente, la relación molar EPL: AM es (1:1).

Cuando interacciona con un compuesto antimicrobiano (CAM) tal como, por ejemplo, ácido gálico o ácido abiético, se forma el complejo conjugado de la invención, la relación molar EPL: AM: CMA se encuentra preferentemente entre (1:1:1) y (1:2:1), ambos inclusive, siendo particularmente preferente que la relación molar sea (1:1:1).

El complejo conjugado que se describe en este documento puede obtener en forma de precipitado amorfo. Sin embargo, en realizaciones preferidas de la invención, el complejo conjugado se presenta en forma de aerogel. Estas nanopartículas pueden obtenerse mediante liofilizado.

Adicionalmente, el complejo conjugado que aquí se describe se presenta preferentemente con un tamaño de partícula máximo de 200 nm.

Adicionalmente, la presente invención proporciona un método para obtener los complejos conjugados descritos anteriormente que comprende las siguientes etapas:

a) preparar una solución que comprende épsilon polilisina (EPL) y un aminoglucósido (AM) de peso molecular igual o inferior a 2000 g/mol, preferentemente oligómeros de quitosano con peso molecular entre 1000 – 2000 g/mol, glucosamina o una combinación de los anteriores;

b) preparar una solución que comprende al menos un compuesto antimicrobiano (CAM), preferentemente en medio alcohólico y, en particular, etanólico;

c) mezclar ambas soluciones y aplicar ultrasonidos para formar el complejo conjugado (EPL-AM-CAM); y

d) aislar el complejo conjugado EPL-AM-CAM, preferentemente en estado sólido o en forma de aerogel

La utilización de aminoglucósicos con un peso molecular igual o inferior a 2 kDa, permite la obtención de un complejo conjugado con tamaño de partícula nanométrico en medio acuoso.

Cuando el sólido se aísla en estado sólido preferentemente mediante eliminación de parte del etanol por destilación a vacío y posterior liofilización; el método puede comprender de forma opcional someter el sólido aislado a trituración o molienda para obtener nanopartículas con un tamaño máximo de 200 nm.

Por otro lado, mediante la utilización de un proceso de liofilización con CO_2 supercrítico (SPC) se facilita la formación de aerogeles frente a hidrogeles.

En la etapa c) de mezcla por sonicación, es decir, aplicación directa de ultrasonidos en la solución, preferentemente 20 kHZ, se forma una sal o hidrogel entre el compuesto

antimicrobiano (CAM), y la matriz formada por EPL-AM. De ser necesario, la aplicación de ultrasonidos puede tener lugar a intervalos, con objeto de evitar que la temperatura de la mezcle supere los 50ºC.

Adicionalmente, la etapa a) también puede comprender la aplicación de ultrasonidos a la solución para facilitar la formación de la matriz EPL-AM. En estos casos, se prefiere la aplicación de ultrasonidos a 20 kHZ, de ser necesario a intervalos para evitar que la temperatura de la mezcla supere los 50ºC.

Adicionalmente, la presente invención se refiere al uso del complejo conjugado que se describe en este documento para el tratamiento de agentes patógenos presente en la agricultura y/o en la naturaleza.

En realizaciones preferidas, la invención se refiere al uso del complejo que aquí se describe para el tratamiento de:

i) hongos del género *Aspergillus*, *Fusarium*, *Alternaria* y/o *Mucor;*

ii) pseudo-hongos tal como *Phytopthora cinnamomi*, o

ii) bacterias tal como Xylella fastidiosa.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Figura 1. Porcentaje de inhibición (PI%) del micelio (*Fusarium culmorum*) para diferentes concentraciones (31,2; 62,5; 125; 250 y 500 µg mL-1) de diferentes preparados. En ordenadas se calcula el poder inhibitorio del crecimiento del hongo en %.

Figura 2. Diámetro (mm) del crecimiento del micelio (*Fusarium culmorum*) para diferentes concentraciones (31,2; 62,5; 125; 250 y 500 µg mL-1) de diferentes preparados.

Figura 3. Porcentaje de inhibición (PI%) del micelio (*Phytophtora cinnamomi* aislado MYC43) para diferentes concentraciones (31,2; 62,5; 125; 250 y 500 µg mL-1) de diferentes preparados.

Figura 4. Efecto de las concentraciones (125, 250 y 500 µg mL-1) de los preparados (EPL+OQ+Ga (a1, b1) y EPL+OQ+Ga+Abietico (a2, b2)) sobre el crecimiento del micelio de Fusarium culmorum (a1, a2) y Phytophtora cinnamomi (aislado MYC43) (b1, b2).

Figura 5: FTIR-ATR del aerogel de plilisina-oligómeros de quitosano-abiético (EPL-OQ-Abiet).

EJEMPLOS

Ejemplo de obtención del complejo EPL-AM-CAM y de su efecto antimicrobiano mejorado.

Para la obtención del complejo se ha elegido como aminoglucósido (AM), oligómeros de quitosano con peso molecular inferior a 2 kDa. Éstos fueron preparados a partir de quitosano de peso molecular medio (suministrado por Hangzhou Simit Chemical Technology Co. Ltd., Hangzhou, China). Para solubilizar el quitosano en agua, se añadieron 10 g de quitosano en 500 ml de ácido acético (1%), y se mantuvo una agitación constante a 60 ° C. Una vez disueltos, se obtuvieron oligómeros de quitosano por degradación oxidativa con H_2O_2 (0,3 $mol \cdot L^{-1}$).

El producto épsilon polilisina (EPL) fue suministrado por Naturcare International Beijing China con un 97% de pureza y de 35 unidades de lisina (aprox. 5500 g/mol).

Para la formación del complejo entre épsilon polilisina (EPL) y los oligómeros de quitosano, se procedió a adicionar lentamente una disolución acuosa formada por 10 g de épsilon polilisina (EPL) en 500 ml de agua bidestilada y desionizada, sobre la solución anteriormente preparada de oligómeros de quitosano. La solución resultante fue sometida a sonicación y la mezcla se emulsionó introduciendo directamente el cabezal del sonicador del equipo de ultrasonidos (frecuencia de 20 kHz) en la solución, durante 10 periodos de 5 minutos cada uno, no dejando que la temperatura superara los 50ºC. Seguidamente la solución se congeló durante 24 horas en un congelador y fue sometida a liofilización. El producto resultante se lavó con etanol absoluto varias veces para eliminar el agua y se sometió finalmente a un proceso de formación de aerogel mediante un equipo criogénico con CO_2 supercrítico (SPC), para formar un aerogel de EPL-AM.

Para la preparación del complejo antimicrobiano EPL-AM-CAM, se partió de 1 gramo del complejo EPL-AM, obtenido tal como se ha descrito anteriormente, y se disolvió en 50 ml de agua bidestilada y desionizada. Posteriormente, se adicionó el compuesto con actividad antimicrobiana: 1 gramo de ácido abiético (Abiet), 1 gramo de ácido gálico (Ga) o 0,5 g de

abiético más 0,5 g de gálico (Ga+Abiet). En todos los casos el compuesto con actividad antimicrobiana se añadió previamente dispersó en 50 ml de etanol.

Se mezclaron ambas soluciones y se aplicó ultrasonidos (frecuencia de 20 kHz) en la solución durante 10 periodos de 5 minutos cada uno, no dejando que la temperatura superara los 50ºC y evaporando el etanol previamente adicionado. Seguidamente la solución se congeló durante 24 horas en un congelador y posteriormente fue sometida a liofilización. El producto resultante se lavó con etanol absoluto varias veces para eliminar el agua y se sometió finalmente a un proceso de formación de aerogel, mediante un equipo criogénico con CO_2 supercrítico (SPC), para formar el complejo conjugado (EPL-AM-CAM siendo CAM ácido abiético, gálico, o mezcla de los dos (1:1)) en forma de aerogel. El aerogel se trituró y se mantuvo sin humedad en un desecador a vacío. Posteriormente, se caracterizó mediante un equipo de microscopía de transmisión electrónica (TEM), sometiendo el sólido aislado a trituración o molienda para obtener nanopartículas con un tamaño máximo de 200 nm.

ENSAYOS DE ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA

A continuación se presentan los resultados de las diferentes pruebas realizadas para determinar la capacidad sinérgica de los diferentes compuestos preparados.

Ensayo 1: Actividad frente al hongo *Fusarium culmorum*

En la figura 1 se observa el poder sinérgico de los compuestos para diferentes combinaciones y concentraciones. Se muestra claramente que para una concentración de 31,2 ug/mL, se obtiene un mayor porcentaje de inhibición (%IP) de la mezcla de EPL+OQ+Ga+Abiet, seguida de EPL+OQ+Ga. Para concentraciones superiores a 62,5 ug/mL y especialmente para concentraciones superiores a 125, 250 y 500 ug/mL se incrementa notablemente el porcentaje de inhibición, pero en todos los casos se manifiesta que el complejo cuaternario presenta un sinergismo superior a los complejos ternarios y un porcentaje de inhibición superior a los binarios y muy superior a los polifenoles ensayados.

Por otro lado, en la figura 2 se muestra el diámetro del crecimiento del micelio. Como puede observarse, para una concentración de 62,5 ug/mL no se observa apenas incremento del diámetro del micelio para las mezclas de EPL+OQ+Ga+Abiet, y tampoco se observa incremento en la mezcla de EPL+OQ+Ga. Para las mezclas binarias se observa en todos

los casos incremento del micelio, lo que implica un carácter sinérgico de las mezclas cuaternarias y ternarias frente a las binarias o frente a los polifenoles ensayados.

Ensayo 2: Actividad frente al hongo *Phytophtora cinnamomi*

Tal como puede observarse en la figura 3, cuando se elige la concentración más baja de reactivo o 62,5 ug/mL, el compuesto que presenta un mayor porcentaje de inhibición es el EPL+OQ+Ga+Abiet, seguido del complejo formado por EPL+OQ+Ga; mientras que los complejos EPL+OQ y EPL+Ga tienen un comportamiento muy similar. Es decir, frente al hongo *Phytophtora cinnamomi* el complejo binario EPL+Ga presenta una actividad equiparable a EPL+ OQ. Por consiguiente todas las especies indicadas muestran actividad frente a este hongo, y solo se puede hablar de sinergismo en relación con los complejos EPL+OQ+Ga y EPL+OQ+Ga+Abiet.

En la figura 4 se muestra el efecto de las concentraciones (125, 250 y 500 µg mL-1) de los preparados EPL+OQ+Ga (a1, b1) y EPL+OQ+Ga+Abiet (a2, b2) sobre el crecimiento del micelio de Fusarium culmorum (a1, a2). Puede observarse claramente que el complejo cuaternario junto con el ternario EPL+OQ+Ga presentan un mejor comportamiento a medida que se incrementa la concentración. Lo mismo ocurre para el aislado de Phytophtora cinnamomi (MYC43) (b1,b2).

Por último se ha caracterizado mediante FTIR-ATR el composite formado por oligómeros de quitosano, polilisina con gálico o abiético (EPL-OQ-Ga-Abiet). En el espectro correspondiente (figura 5) pueden observarse:

- bandas en la región de tensión N-H y O-H
  3227 – oligómeros de quitosano, determinada por *υ*(OH) sobrelapada con υ_s(N–H).

- bandas en la región de huellas dactilares:
  1667 –ν(C=O) de amida I de polilisina (en forma de α-hélices);
  1557 – ν(C=O) de amida II de polilisina,
  1386 – oligómeros de quitosano, atribuida a δ(–CH_3);
  1255 – amida III (deformación axial de vibraciones del enlace C-N y vibraciones de flexión C=O);
  1152 –oligómeros de quitosano, determinado por υ_{as}(C=O) puentes de oxígeno resultantes de la deacetilación del quitosano;

1067 – oligómeros de quitosano, determinado por υ(C=O), por los enlaces C–O–H, C–O–C y CH2CO;

894 – oligómeros de quitosano.

REIVINDICACIONES

1.- Un complejo conjugado que comprende: i) épsilon-polilisina (EPL), ii) un aminoglucósico (AM) de peso molecular igual o inferior a 2000 g/mol y iii) al menos un compuesto con actividad antimicrobiana (CAM).

2.- El complejo conjugado según la reivindicación 1, donde la épsilon-polilisina y el aminoglucósido forman una matriz polimérica, y el compuesto antimicrobiano tiene al menos un grupo funcional con capacidad de unirse a dicha matriz.

3.- El complejo conjugado según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, donde el aminoglucósido se selecciona del grupo que consiste en oligómero de quitosano con peso molecular entre 1000 y 2000 g/mol, glucosamina y una combinación de los anteriores.

4.- El complejo conjugado según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, donde el compuesto antimicrobiano se selecciona del grupo que consiste en un ácido polifenólico, un ácido terpénico y una combinación de éstos.

5.- El complejo conjugado según la reivindicación 4, donde el compuesto antimicrobiano se selecciona del grupo que consiste en ácido gálico, ácido elágico, galotaninos, elegitaninos, ácido ferúlico, ácido cafeico, ácido rosmarícico, ácido abiético, ácido oleanólico, ácido boswélico y una combinación de los anteriores.

6- El complejo conjugado según una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 5 donde la relación molar entre épsilon-polilisina (EPL) y aminoglucósido (AM) en la matriz EPL-AM se encuentra entre (1:1) y (1:2).

7.- El complejo conjugado según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, donde la relación molar entre la épsilon-polilisina (EPL), el aminoglucósido (AM) y el compuesto antimicrobiano (CAM) se encuentra entre (1:1:1) y (1:2:1).

8.- El complejo conjugado según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, donde el complejo conjugado es un aerogel formado por partículas de tamaño nanométrico.

9.- El complejo conjugado según la reivindicación 8, donde las nanopartículas de aerogel tienen un tamaño de partícula máximo de 200 nm.

10.- Un método para obtener el complejo conjugado que se describe en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, donde el método comprende las siguientes etapas:

a) preparar una solución que comprende épsilon polilisina (EPL) y un aminoglucósido (AM) con peso molecular igual o inferior a 2000 g/mol;

b) preparar una solución que comprende al menos un compuesto antimicrobiano (CAM);

c) mezclar ambas soluciones y aplicar ultrasonidos para formar el complejo conjugado (EPL-AM-CAM); y

d) aislar el complejo conjugado EPL-AM-CAM.

11.- El método para obtener el complejo conjugado según la reivindicación 10, donde la solución que comprende épsilon polilisina (EPL) y un aminoglucósido (AM) es una solución en medio acuoso.

12.- El método para obtener el complejo conjugado según una cualquiera de las reivindicaciones 10 a 11, donde la solución que comprende el compuesto antimicrobiano (CAM) es una solución en medio alcohólico.

13.- Uso del complejo conjugado que se describe en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, para el tratamiento contra microbios patógenos presente en la naturaleza y/o agricultura.

14.- Uso del complejo conjugado según la reivindicación 13, donde microbio patógeno se selecciona del grupo que consiste en:

a) hongos del género *Aspergillus*, *Fusarium*, *Alternaria* y/o *Mucor;*

b) pseudo-hongos tal como *Phytopthora cinnamomi*, y

c) bacterias tal como *Xylella fastidiosa*.

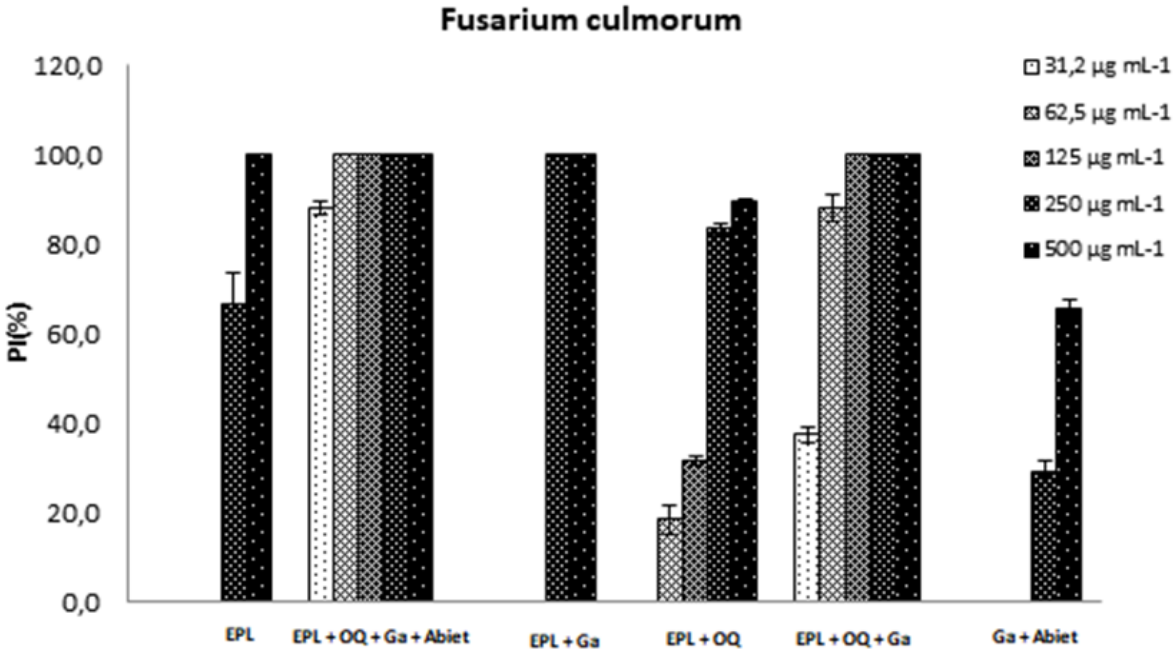

Fusarium culmorum
120,0
100,0
80,0
60,0
40,0
20,0
0,0
PI(%)
31,2 µg mL-1
62,5 µg mL-1
125 µg mL-1
250 µg mL-1
500 µg mL-1
EPL
EPL + OQ + Ga + Abiet
EPL + Ga
EPL + OQ
EPL + OQ + Ga
Ga + Abiet

Fig. 1

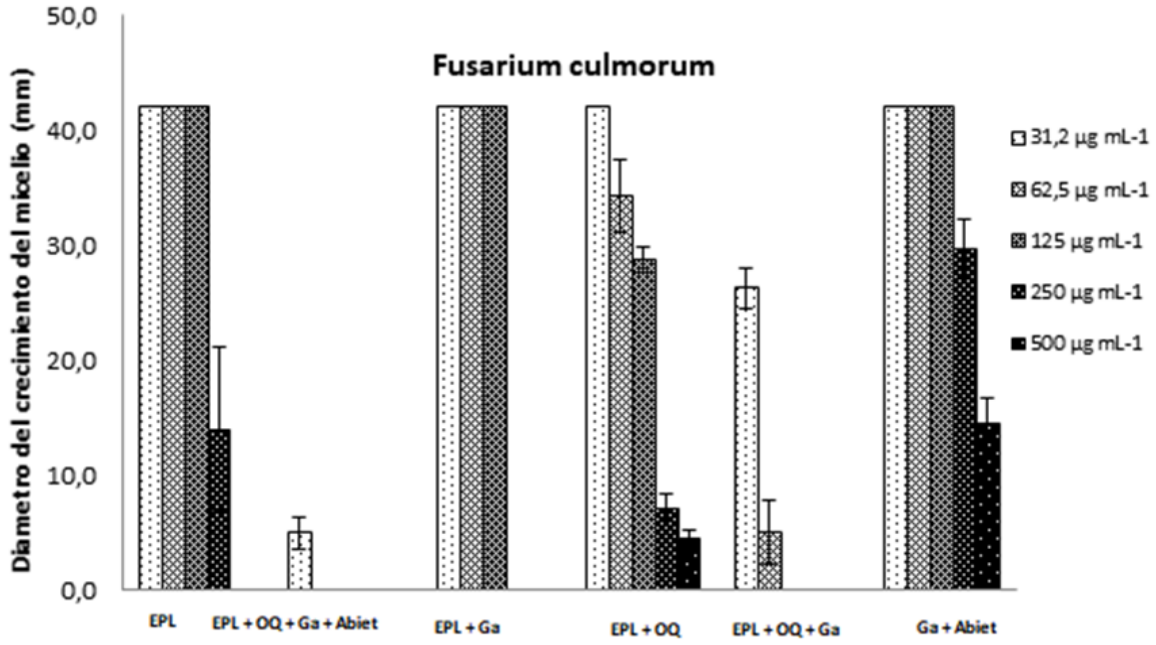

Fusarium culmorum
50,0
40,0
30,0
20,0
10,0
0,0
Diametro del crecimiento del micelio (mm)
31,2 µg mL-1
62,5 µg mL-1
125 µg mL-1
250 µg mL-1
500 µg mL-1
EPL
EPL + OQ + Ga + Abiet
EPL + Ga
EPL + OQ
EPL + OQ + Ga
Ga + Abiet

Fig. 2

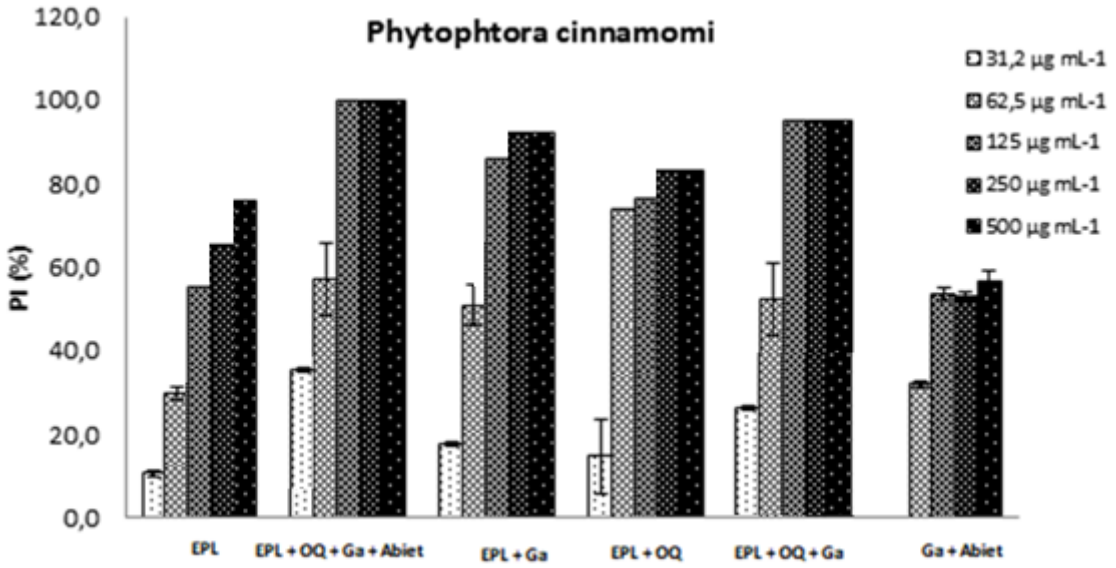

Phytophtora cinnamomi
PI (%)
120,0
100,0
80,0
60,0
40,0
20,0
0,0
31,2 µg mL-1
62,5 µg mL-1
125 µg mL-1
250 µg mL-1
500 µg mL-1
EPL
EPL + OQ + Ga + Abiet
EPL + Ga
EPL + OQ
EPL + OQ + Ga
Ga + Abiet

Fig. 3

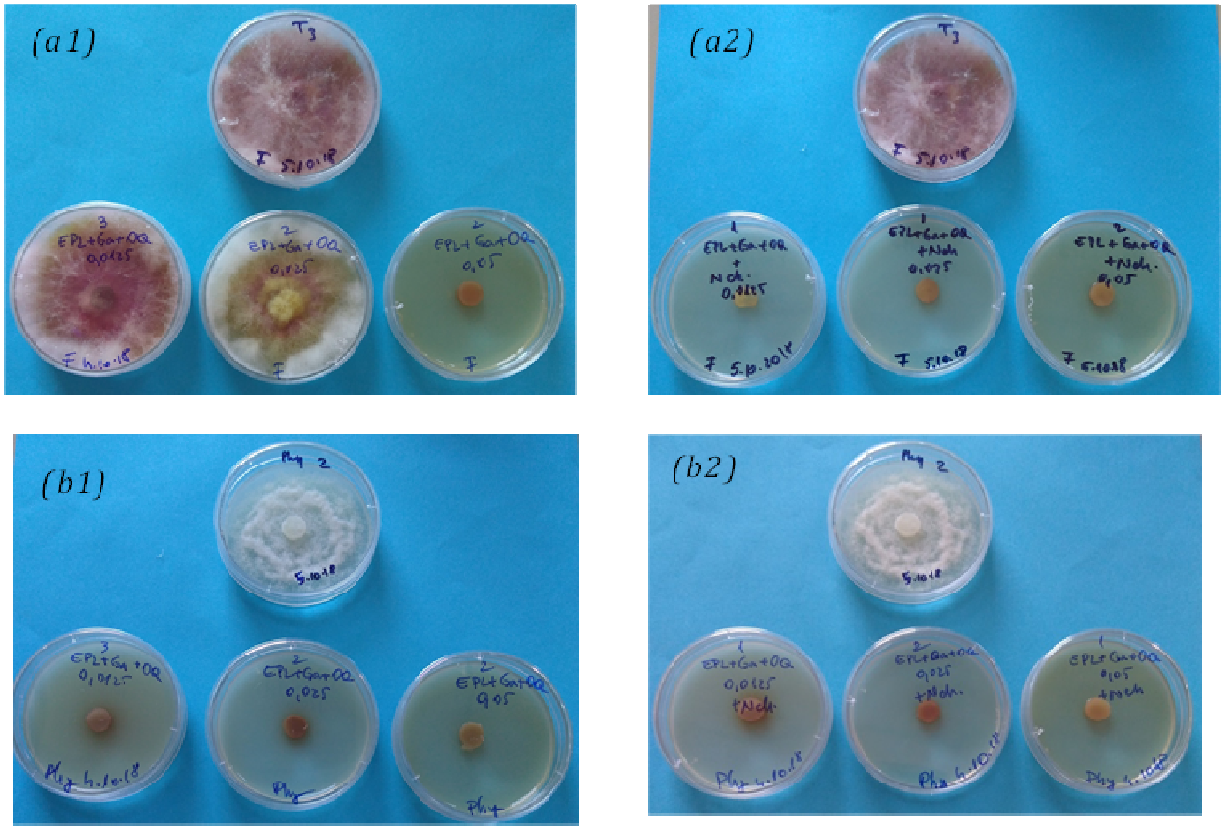

(a1)
(a2)
(b1)
(b2)

Fig. 4

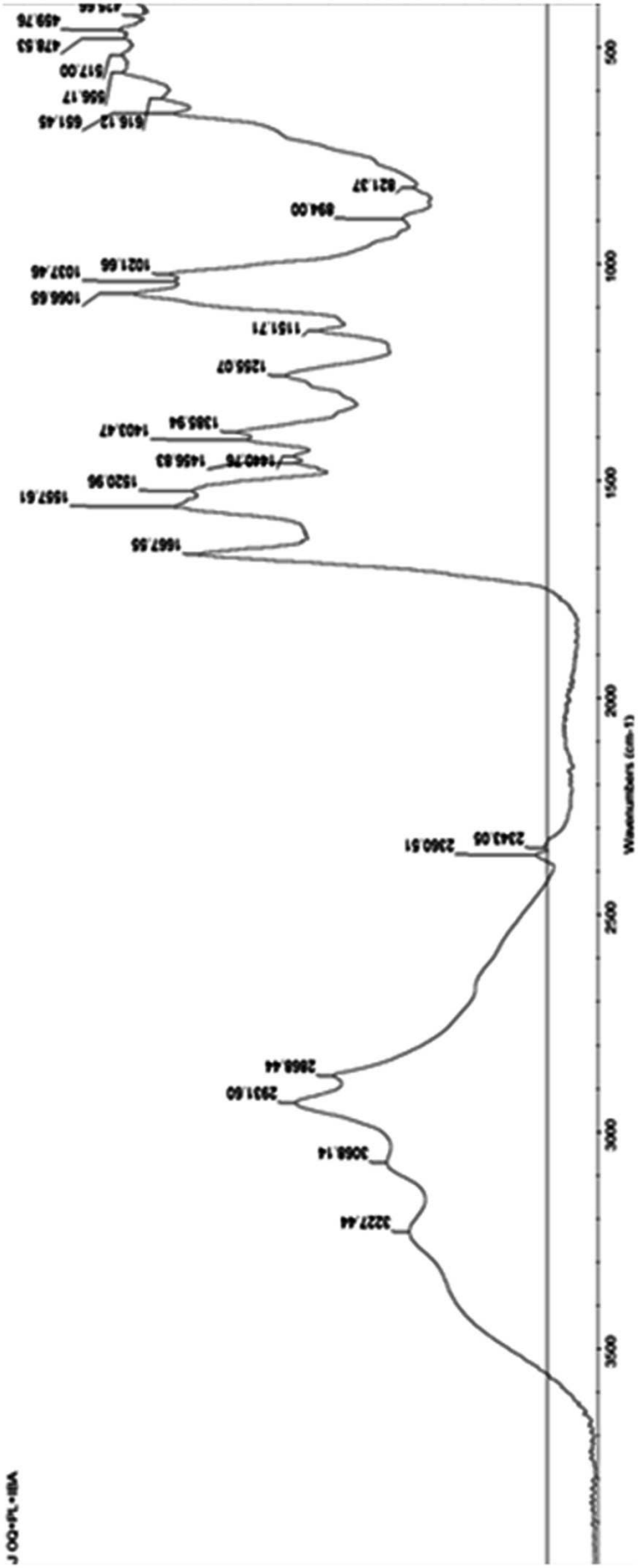

459.76
478.53
517.00
566.17
616.12
651.45
821.37
894.00
1021.66
1037.46
1066.65
1151.71
1255.07
1385.94
1403.47
1440.76
1456.83
1520.96
1557.61
1667.56
2343.06
2360.51
2868.44
2931.60
3058.14
3227.44
500
1000
1500
2000
2500
3000
3500
Wavenumbers (cm-1)

Fig. 5

OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(21) N.º solicitud: 201831106

(22) Fecha de presentación de la solicitud: 15.11.2018

(32) Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

(51) **Int. Cl. :** ***A01N33/04*** (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	(56) **Documentos citados**	**Reivindicaciones afectadas**
X	CN 104082830 A (NANTONG HAOYOU FOOD ADDITIVES CO LTD) 08/10/2014, resumen; reivindicaciones	1-14
X	CN 102578208 A (UNIV SHANGHAI OCEAN) 18/07/2012, resumen descripción	1-14
X	CN 105941594 A (UNIV NANJING TECH) 21/09/2016, resumen; descripción	1-14
A	RAMIREZ_ARISTIZABAL L.S. et al. Determinación de compuests fenólicos (catequinas, cafeína, ácidos orgánicos) en té verde (Camellia sinensis) usando cromatografía líquida de alta resolución.. Vitae, 2016, Vol. 23, Páginas 245-249 [en línea][recuperado el 21/02/2019]. . tablas 2, 3 y 4	1-14
A	MUÑOZ CENTENO L.M. Plantas medicinales españolas. Rosmarinus officinalis l.(Lamiaceae) (Romero). STUD.BOT.2002, Vol. 21, Páginas 105-118 [en línea][recuperado el 21/02/2019]. , ISSN 0211-9714. página 112	1-14

Categoría de los documentos citados
X: de particular relevancia
Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría
A: refleja el estado de la técnica
O: referido a divulgación no escrita
P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud
E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

☒ para todas las reivindicaciones ☐ para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe	**Examinador**	**Página**
22.02.2019	M. Ojanguren Fernández	1/2

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

A01N

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

INVENES, EPODOC, WPI, CAS, GOOGLE ACADÉMICO