

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 940 132**

21 Número de solicitud: 202131019

51 Int. Cl.:

A01N 25/28 (2006.01)
A01N 65/00 (2009.01)
C08L 5/08 (2006.01)
C08L 97/00 (2006.01)
A01P 1/00 (2006.01)
A01P 3/00 (2006.01)
C02F 1/28 (2006.01)
C02F 1/62 (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación:

29.10.2021

43 Fecha de publicación de la solicitud:

03.05.2023

71 Solicitantes:

UNIVERSIDAD DE VALLADOLID (100.0%)
Plaza de Santa Cruz 5, Bajo
47002 Valladolid ES

72 Inventor/es:

SÁNCHEZ HERNÁNDEZ, Eva;
MARTÍN GIL, Jesús;
BUZÓN DURÁN, Laura y
MARTÍN RAMOS, Pablo

74 Agente/Representante:

CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel

54 Título: **COMPUESTO RETICULADO DE LIGNINA METACRILADA Y OLIGÓMEROS DE QUITOSANO CAPAZ DE ACTUAR COMO NANOTRANSPORTADOR DE COMPUESTOS BIOACTIVOS, MÉTODO DE OBTENCIÓN Y USOS**

57 Resumen:

La presente invención describe un compuesto reticulado formado por lignina metacrilada (LM) y oligómeros de quitosano (COS) de entre 1500-3000 Da capaz de formar un complejo de inclusión con un compuesto bioactivo natural (CBA), actuando así como nanotransportador. La invención también comprende el método de obtención de dicho nanotransportador y sus usos en el tratamiento de enfermedades y efectos causados por fitopatógenos en plantas.

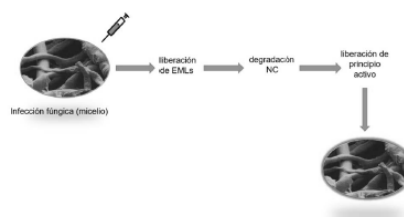


Fig. 1

DESCRIPCIÓN

COMPUESTO RETICULADO DE LIGNINA METACRILADA Y OLIGÓMEROS DE QUITOSANO CAPAZ DE ACTUAR COMO NANOTRANSPORTADOR DE COMPUESTOS BIOACTIVOS, MÉTODO DE OBTENCIÓN Y USOS

10 **Campo de la invención**

La presente invención describe un nanotransportador capaz de encapsular un producto bioactivo natural para actuar contra hongos y bacterias patógenos de las plantas, con aplicación como producto fitosanitario en el ámbito agroforestal.

15 **Antecedentes de la invención**

Las enfermedades asociadas a hongos fitopatógenos son responsables de importantes pérdidas económicas, afectando a los principales cultivos herbáceos y leñosos.

20 El uso continuado de los agroquímicos de síntesis típicos para controlar estas enfermedades presenta inconvenientes de toxicidad y eficacia. En los últimos años muchos de estos productos o bien han sido prohibidos o ha aumentado la presión pública para reducir su uso.

25 Por tanto, la implementación de métodos de Manejo Integrado de Plagas (MIP) se ha convertido en un objetivo prioritario en el control de enfermedades, ya sea por agentes de biocontrol, es decir, el uso de microorganismos endofíticos como antagonistas microbianos capaces de controlar e inhibir el crecimiento de hongos y bacterias fitopatógenas, o por la aplicación de sustancias de origen natural que sean seguras y efectivas.

30

En el marco del MIP se ha descrito la utilización de extractos de plantas tales como *Rubia tinctorum*, *Silybum marianum*, *Urtica dioica* o *Equisetum arvense* frente a hongos de la madera de la vid (HMY). Langa-Lomba ha analizado la eficacia de extractos de *U. dioica* y *E. arvense* combinados con quitosano libre frente a ocho especies de Botryosphaeriaceae características (Langa-lomba N. y cols. "Assessment of conjugate complexes of chitosan and *Urtica dioica* or *Equisetum arvense* extracts for the control of grapevine trunk pathogens"; Agronomy 2021, 11(5), 976).

El quitosano es un polisacárido lineal de origen natural compuesto por cadenas de N-glucosamina que resulta de la desacetilización de la quitina. La quitina es un componente estructural de las paredes celulares de hongos, del exoesqueleto de artrópodos y de órganos de otros organismos invertebrados. Tanto el quitosano como sus derivados son de un gran interés por su actividad antimicrobiana y características de biocompatibilidad, no toxicidad y biodegradabilidad.

En un artículo de revisión de López-Moya se han descrito los mecanismos moleculares detrás de las interacciones del quitosano con plantas y hongos (López Moya F. y cols. “Molecular mechanisms of chitosan interactions with fungi and plants”. *Int. J. Mol. Sci.* 2019, 20, 332). Como agente antimicrobiano permeabiliza las membranas plasmáticas fúngicas desencadenando la producción intracelular de ROS y la muerte celular, detiene la germinación y el crecimiento por la privación de nutrientes y altera la expresión génica, entre otros efectos.

El polímero de quitosano puede actuar también de transportador de compuestos activos. En este sentido, Ciftci ha descrito la síntesis de microcápsulas compuestas de quitosano que contienen terpolímero de metacrilato de glicidilo (GMA), anhídrido maleico (MA) y N-terc-butilacrilamida (NTBA) (Ciftci N. y cols. “Ascorbic Acid Adsorption-Release Performance and Antibacterial Activity of Chitosan-ter (GMA-MA-NTBA) Polymer Microcapsules”; *Journal of Polymers and the Environment* (2020) 28:2277–2288). Pathania describe la preparación de un nanocompuesto de quitosano-g-poli(acrilamida) por un método simple con microondas (Pathania D. y cols. “Fabrication of chitosan-g-poly(acrylamide)/CuS nanocomposite for controlled drug delivery and antibacterial activity”; *Materials Science and Engineering C* 64 (2016) 428-435).

Sin embargo, la mayoría de los compuestos polifenólicos y terpénicos presentes en los extractos de plantas, así como muchos otros compuestos con actividad antimicrobiana, presentan baja hidrosolubilidad. Su uso en el tratamiento contra agentes patógenos con los sistemas anteriores no resulta suficientemente efectivo. Existe por tanto la necesidad de desarrollar nanotransportadores que permitan vehicular toda la variedad de compuestos antimicrobianos para tratar las enfermedades causadas por los agentes fitopatógenos.

La lignina es un poliéter-poliol aromático altamente reticulado que se separa de la celulosa y la hemicelulosa en el proceso de la producción de papel para originar la

lignina Kraft, y presenta grupos funcionales que pueden sufrir modificaciones adicionales.

La solicitud WO 20170134308 A1 describe un nanotransportador de lignina que reacciona con grupos amino por reacción Aza-Michael formando redes lignina-diamina-lignina. Utiliza una lignina química modificada para presentar dos grupos hidroxilo funcionales para la polimerización, preferiblemente lignina metacrilada. El espacio generado para el alojamiento del compuesto activo es de dimensiones discretas y no permite acoger de forma estable una molécula tan grande como un flavonoide natural o un terpeno – aparte de que la adición del compuesto activo se realiza en un medio hidrofóbico, lo cual condiciona su biodisponibilidad.

Zou describe la formación de películas en las que una capa de quitosano recubre partículas de lignina coloidal (Zou T. y cols. “Natural Shape-Retaining Microcapsules With Shells Made of Chitosan-Coated Colloidal Lignin Particles”, *Frontiers in Chemistry*, 2019, 7, 370). Rosova también describe la síntesis de una película de lignina-quitosano con el quitosano recubriendo la lignina (Rosova E. y cols. “Biocomposite Materials Based on Chitosan and Lignin: Preparation and Characterization”; *Cosmetics* 2021, 8, 24). Sin embargo, las películas de quitosano descritas por Zou y Rosova sólo recubren a las partículas de lignina coloidal; en ningún caso describen o sugieren la inserción de oligómeros de quitosano entre ligninas con enlaces químicos para formar un compuesto reticulado, cuya presencia determinaría un comportamiento como transportador en vez de como biopelícula.

En la misma línea, Alireza describe biocomposites de lignina-quitosano donde no se evidencia la existencia de interacciones covalentes entre estos grupos (Alireza Aradmehr y cols., A novel biofilm based on lignocellulosic compounds and chitosan modified with silver nanoparticles with multifunctional properties: Synthesis and characterization *Colloids and Surfaces A* 600 (2020) 124952).

El problema de la técnica se puede plantear como la necesidad de aumentar la eficiencia de los compuestos bioactivos naturales en el tratamiento de enfermedades y efectos causados por los agentes fitopatógenos. La solución que propone la presente invención es un compuesto reticulado de lignina y quitosano capaz de actuar como nanotransportador de dichos compuestos bioactivos naturales formando un complejo de inclusión.

Descripción de la invención

Un primer aspecto de la presente invención es un compuesto reticulado formado por lignina metacrilada (LM) y oligómeros de quitosano (COS) de peso molecular medio <2000 Da, preferiblemente con un peso molecular entre 1500-3000 Da, más
 5 preferiblemente entre 1500-2000 Da. La relación molar LM:COS es preferiblemente de 2:1.

El compuesto reticulado de la invención presenta estructura LM-COS-LM, donde el COS actúa como agente de reticulación unido por enlace covalente con la acroleína de la
 10 lignina metacrilada. El tamaño de los oligómeros de quitosano facilita la entrada y encapsulación de compuestos bioactivos grandes tales como flavonoides, di- y triterpenos.

En la presente invención se define compuesto reticulado como el compuesto formado por al menos dos componentes unidos por enlace covalente en estructura de retícula -
 15 en particular, lignina metacrilada y quitosano, en una estructura que resulta estable hasta 350°C (Ejemplo 5.2). Se trata de un material más estable que los compuestos lignina-diamina-lignina referidos en la técnica.

El compuesto reticulado LM-COS-LM se forma por una reacción Aza-Michael modificada que origina una matriz esférica capaz de alojar un Compuesto Bioactivo (CBA) natural por la interacción de, al menos, un grupo funcional de la red LM-COS y
 20 dicho CBA.

Otro aspecto preferible de la presente invención, por tanto, es un nanotransportador que comprende dicho compuesto reticulado y un CBA natural que interaccionan entre ellos por enlaces iónicos o de hidrógeno formando un complejo de inclusión. La relación molar LM:COS:CBA del complejo de inclusión formado es preferiblemente de (2:1:1).
 25

El comportamiento térmico de este complejo resulta muy diferente del compuesto reticulado sin CBA. Lo que muestra el Ejemplo 5.2 es que ha de ser atribuido a la presencia de los componentes del extracto de *Rubia tinctorum* dentro de la cobertura LM-COS-LM. Se presenta como un complejo de inclusión con una degradación secuencial sorprendente y muy ventajosa en su función como nanotransportador.
 30

El nanotransportador de la presente invención mejora la biodisponibilidad de los CBA que vehicula, reduciendo la cantidad de compuesto bioactivo requerida y controlando
 35

su liberación. El complejo funciona además de una manera más eficaz como antimicrobiano por incorporar quitosano, que permeabiliza las membranas plasmáticas fúngicas y altera su expresión génica, aunque se puede prever que el quitosano metacrilado usado en la invención no va a tener la misma actividad que el quitosano libre.

En la presente invención se define extracto biológico como un medio extraído de una planta por procesos naturales que comprende al menos un compuesto bioactivo y ausencia de pesticidas, abonos químicos o sustancias sintéticas.

En la presente invención se define compuesto bioactivo (CBA) como un compuesto orgánico con actividad antimicrobiana frente a fitopatógenos, más preferiblemente contra patógenos de la madera. En un aspecto de la invención, los CBAs son de origen sintético, como carbamatos, compuestos azoicos, compuestos bencénicos sustituidos y compuestos organometálicos. En un aspecto más preferible, los CBAs son naturales y alineados con el Reglamento (CE) nº 1107/2009, aptos para su uso en Agricultura Ecológica o convencional. Los CBA naturales son preferiblemente polifenoles, terpenos, aceites esenciales incluyendo aceites terpénicos, vitaminas, carotenoides, ácido fenilpropanóico, fitoestrógenos, ácidos grasos, lignanos, cumestatos, prebióticos, xantofilas, o combinaciones de ellos. Muy preferiblemente, el CBA natural es un polifenol o una mezcla de polifenoles.

El CBA a encapsular en el compuesto reticulado LM-COS-LM para formar el complejo tiene preferiblemente al menos un grupo funcional con capacidad de unirse a la matriz formada por LM y COS bien por enlace iónico o por enlace de hidrógeno.

Los nanotransportadores de la presente invención son capaces de responder a estímulos externos en los sitios de infección desencadenando una liberación controlada de los agentes bioactivos. Las bacterias y hongos asociados a las enfermedades de la madera que afectan a cultivos leñosos secretan ciertas enzimas que degradan la lignina actuando sobre el complejo COS-lignínico de la invención, liberando el CBA y destruyendo así el patógeno.

La liberación controlada por la inducción de enzimas hace al nanotransportador de la presente invención especialmente indicado para vehicular CBAs hidrofóbicos pues permite vehicularlos en medios acuosos; en particular, de aquellos cuya biodisponibilidad supone dificultades por razones de protección y estabilidad en

fertirrigación o endoterapia. El nanotransportador de la invención presenta una elevada estabilidad en disolución, incrementa la biodisponibilidad de compuestos bioactivos permitiendo así reducir la cantidad a utilizar, controla su liberación y evita el empleo generalizado de agroquímicos.

5

La actividad antifúngica del quitosano favorece además la sinergia del efecto conseguido. El quitosano se considera un candidato antifúngico ideal debido a su mecanismo no específico de supresión de patógenos; por otro lado, presenta gran cantidad de grupos funcionales, como el hidroxilo y el amino, y es considerado un

10 polication con una alta densidad de cargas positivas ideal para interaccionar con compuestos bioactivos.

El complejo de la invención presenta actividad sinérgica, es decir, la administración del nanotransportador mejora los parámetros frente a la administración por separado de

15 cada uno de sus componentes frente a fitopatógenos.

El Ejemplo 8 muestra la actividad fungistática del compuesto reticulado LM-COS-LM frente a *N. parvum*, elegido por ser uno de los hongos más virulentos de la familia Botryosphaeriaceae, que no consiguió inhibir por completo el micelio fúngico a la mayor

20 concentración estudiada de 150 µg/mL. Se puede prever que para otros hongos de esta misma familia los resultados del complejo LM-COS-LM han de ser similares.

En la presente invención se define actividad fungistática como la inhibición del crecimiento de un fitopatógeno. Es el efecto que correspondería al quitosano.

25

En la presente invención se define actividad fungicida como la eliminación del fitopatógeno, efecto que consigue cualquiera de los CBA descritos.

Al comparar los complejos cargados con compuestos bioactivos respecto a dichos compuestos bioactivos sin encapsular (los extractos) se observa que los complejos siempre presentaron una eficacia mejorada (Ejemplo 6, tabla 1), destacando los valores obtenidos para el complejo LM-COS-*R. tinctorum*. De modo que un aspecto muy

30 preferible de la invención es un nanotransportador cargado con CBAs naturales de un extracto de *R. tinctorum*.

35

Otro aspecto de la presente invención es un procedimiento para obtener un compuesto reticulado con capacidad para actuar como nanotransportador que comprende las siguientes etapas:

- 5 a) preparación de una disolución acuosa o hidroalcohólica, preferiblemente hidrometanólica, que comprende lignina metacrilada (LM) y oligómeros de quitosano (COS) en una relación molar de 3:1 a 2:1;
- b) aplicación de ultrasonidos para formar el compuesto reticulado (LM-COS-LM) a una temperatura inferior a 50°C, preferiblemente de 10 a 20 kHz, más preferiblemente a 20 kHz;
- 10 c) aislamiento del compuesto LM-COS-LM preferiblemente en forma de aerogel o en estado sólido, en cuyo caso muy preferiblemente por destilación al vacío y posterior liofilización.

Otro aspecto preferible es un procedimiento de obtención del nanotransportador de la invención a partir del compuesto reticulado obtenido en el paso b) del procedimiento anterior. Las siguientes etapas serían la adición de un compuesto bioactivo (CBA) en forma sólida o en disolución: la aplicación de ultrasonidos a una temperatura inferior a 50°C, preferiblemente de 10 a 20 kHz, más preferiblemente de 20 kHz, para obtener una disolución coloidal; y el aislamiento del complejo LM-COS-CBA preferiblemente en forma de aerogel o en estado sólido, en cuyo caso más preferiblemente por destilación al vacío y posterior liofilización.

Otro aspecto más preferible es un procedimiento de obtención de un nanotransportador formado de forma simultánea por el compuesto reticulado LM-COS-LM y un CBA. El procedimiento incluye la presencia de todos los componentes en el momento de iniciar la reticulación con ultrasonidos, y comprende:

- a) la preparación de una disolución acuosa o hidroalcohólica, preferiblemente hidrometanólica, que comprende lignina metacrilada (LM) y oligómeros de quitosano (COS) en una relación molar de 3:1 a 2:1,
- 30 y un compuesto bioactivo (CBA) en forma sólida o líquida, con una relación molar LM:COS:CBA preferiblemente de 3:1:0,5, o preferiblemente 2:1:0,5;
- b) la aplicación de ultrasonidos para formar el complejo de inclusión (LM-COS-CBA) a una temperatura inferior a 50°C, preferiblemente de 10 a 20 kHz, más preferiblemente de 20 kHz, para obtener una disolución coloidal;
- 35

- c) aislamiento del complejo LM-COS-CBA preferiblemente en forma de aerogel o en estado sólido, en cuyo caso más preferiblemente por destilación al vacío y posterior liofilización.

- 5 En un aspecto de la invención, la disolución acuosa de la etapa a) puede ser coloidal o verdadera. El orden de incorporación a la disolución de los compuestos es irrelevante.

La amina del oligómero de quitosano reacciona con el grupo metilo de la lignina metacrilada dando lugar a la formación de un compuesto reticulado por reacción Aza-
10 Michael, y posteriormente los grupos hidroxilos libres de los COS interaccionan con al menos un grupo funcional de los CBAs formando puentes de hidrógeno débiles o enlaces iónicos.

El nanotransportador obtenido es vehiculable en agua ya que tras la sonicación por
15 ultrasonidos resulta nanodispersado, con características de disolución coloidal o verdadera.

Otro aspecto preferible de la invención es el uso del nanotransportador para el
tratamiento de enfermedades o efectos de agentes patógenos en plantas.

20

Las plantas que se pueden tratar con el nanotransportador de la presente invención comprenden típicamente plantas con semillas, preferiblemente plantas leñosas y más preferiblemente de los géneros *Vitis*, *Prunus*, *Pistacia*, *Olea*, *Platanus*, *Malus*, *Punica*, *Ulmus* o *Nerium*, *Vitis vinifera*, *Prunus dulcis*, *Prunus persica*, *Pistacia vera* u *Olea europaea*.
25

Los hongos o bacterias susceptibles de infectar y causar enfermedades a las plantas comprenden los agentes patógenos degradantes de lignina. La lignina puede ser degradada por enzimas como la lacasa, lignina peroxidasa, manganeso peroxidasa o
30 alquil-aril eterasa.

En una realización preferible, dichos agentes patógenos están seleccionados entre:

- a) hongos de los géneros *Botryosphaeria*, *Diplodia*, *Neofusicoccum*, *Fusarium*, *Cryphonectria*, *Dothiorella*, *Lasidiplodia*, *Phaeobotryosphaeria*, *Spencermartinsia*,
35 *Phaeomoniella*, *Phaeoacremonium*, *Codophora*, *Fomitiporia*, *Inocutis*, *Phellinus*, *Stereum*, *Eutypa*, *Eutypella*, *Cryptosphaeria*, *Cryptovalsa*, *Diatrype*, *Diatrypella*, *Pleurostomophora* y/o *Diaporthe*;

- b) pseudohongos del género *Phytophthora*, como *P. cinnamomi* o *P. cactorum*; y
- c) hongos de la pudrición blanca de la madera, del género *Armillaria*.
- d) bacterias del Orden Pseudomonadales y Xanthomonadales como *Pseudomonas syringae* y *Xylophilus ampelinus*, respectivamente.

5

En una realización más preferible, las enfermedades fúngicas causadas en plantas por dichos hongos se seleccionan entre las enfermedades de la madera, raíz y cuello, mal del plomo o enfermedad de la hoja plateada, verticilosis, botriosfera, septoria y antracnosis; mientras que la enfermedades causadas por bacterias se seleccionan entre bacteriosis, chancros, necrosis y marchitez bacteriana de frutales con hueso - Si bien los nanotransportadores de la invención son preferiblemente empleados en enfermedades de la madera de la vid.

15

En un aspecto de la presente invención, el nanotransportador se administra a la planta por inyección radicular, aplicación foliar o por endoterapia o inyección en la parte aérea de la planta a tratar, muy preferiblemente por endoterapia.

20

Otro aspecto preferible es el uso del compuesto reticulado de la presente invención para la extracción de metales pesados en agua.

Breve descripción de las figuras

25

Figura 1. Mecanismo de actuación del nanotransportador (NC) en el tratamiento de las enfermedades fúngicas de la madera de la vid. El micelio fúngico genera enzimas modificadoras de la lignina (EMLs) que provocan la liberación del principio activo y, como consecuencia, la destrucción del micelio fúngico. La jeringuilla representa inyección del NC por endoterapia.

30

Figura 2. Fórmula de la lignina metacrilada (LM) por adición de anhídrido metacrílico al polímero de lignina, con monómeros de unidades *p*-hidroxifenil (H), guaiacil (G) y siringil (S).

35

Figura 3. Proceso de reticulación de la lignina metacrilada (LM) con oligómeros de quitosano (COS) encapsulando un principio activo de origen natural. Las fotos representan la interacción de los compuestos bioactivos (CBA) con la matriz de LM-COS-LM, así como el proceso de reticulación entre COS y LM. Los cubos azules representan los CBAs.

Figura 4. Espectros ATR-FTIR del compuesto reticulado LM-COS-LM liofilizado (línea azul), nanotransportadores con reticulación de amina sintética (línea morada) y oligómeros de quitosano obtenidos por vía enzimática (línea roja).

Figura 5. Espectros ATR-FTIR del complejo de inclusión LM-COS cargado con extracto de *R. tinctorum* (línea azul), del compuesto reticulado LM-COS-LM (línea morada) y de extracto de *R. tinctorum* liofilizada (línea roja).

Figura 6a. Curvas de análisis térmico del compuesto reticulado LM-COS-LM. Se observa a 200°C una pérdida de peso del 9% y hasta 750°C de un 7% adicional. A 350°C se produce un pico exotérmico o de descomposición (alta estabilidad de la molécula).

Figura 6b. Curvas de análisis térmico del complejo de inclusión LM-COS cargado con *R. tinctorum*. Se observan tres etapas sucesivas de pérdidas de peso de 12%, 30% y 10% (164°C, 296°C y 412°C). La descomposición se produce a 510°C (pico exotérmico) y a 750°C la pérdida de peso es de 28% (compuesto ternario de mayor estabilidad térmica).

Figura 7a y 7b. Imágenes de microscopía electrónica de barrido (SEM) que muestran la formación de dendritas del nanotransportador por la adición de alcohol.

Figuras 8a, 8b y 8c. Imágenes de microscopía electrónica de barrido (SEM) que muestran la ruptura de las dendritas por la adición de agua y posterior sonicación durante 5 minutos en periodos de 1 min, formando esferas cargadas con el compuesto bioactivo. La figura 8c muestra el tamaño del nanotransportador cargado con *R. tinctorum*.

Figura 9. Efecto de las concentraciones (de arriba abajo - 6,25; 9,375; 12,5; 18,75; 25; 37,5; 50; 75; 100; 150 µg/mL) de los preparados sobre el crecimiento del micelio de *N. parvum*: (a) LM+COS+*R. tinctorum*; (b) LM+COS+*S. marianum*; (c) LM+COS+*E. arvense*; (d) LM+COS+*U. dioica*.

Figuras 10a, 10b, 10c y 10d. Diámetro (en mm) del crecimiento del micelio (*N. parvum*) para diferentes concentraciones (de izq. a dcha. - 6,25; 9,375; 12,5; 18,75; 25; 37,5; 50; 75; 100; 150 µg/mL) de los nanotransportadores LM-COS-*R. tinctorum*, LM-COS-*S. marianum*, LM-COS-*E. arvense*, LM-COS-*U. dioica*. Las mismas letras sobre las concentraciones significan que no son significativamente diferentes a $p < 0.05$.

Figura 11. Diámetro (en mm) del crecimiento del micelio (*D. seriata*) para diferentes concentraciones (de izq. a dcha. - 6,25; 9,375; 12,5; 18,75; 25; 37,5; 50; 75; 100; 150 µg/mL) del nanotransportador LM-COS-*R. tinctorum*. Las mismas letras sobre las concentraciones significan que no son significativamente diferentes a $p < 0.05$.

Figura 12. Diámetro (en mm) del crecimiento del micelio (*N. parvum*) para diferentes concentraciones (de izq. a dcha. - 6,25; 9,375; 12,5; 18,75; 25; 37,5; 50; 75; 100; 150 µg/mL) del compuesto reticulado LM-COS-LM. Las mismas letras sobre las concentraciones significan que no son significativamente diferentes a $p < 0.05$.

EJEMPLOS**Ejemplo 1: Obtención de la lignina metacrilada (LM), oligómeros de quitosano (COS) y extractos naturales con Compuestos Bioactivos (CBAs)**

La síntesis de la lignina metacrilada (LM) se realizó según el procedimiento de Fischer y cols. en “Targeted drug delivery in plants: Enzyme-responsive lignin nanocarriers for the curative treatment of the worldwide grapevine trunk disease Esca” [Adv. Sci. 2019, 6, 1802315. DOI: 10.1002/advs.201802315], con modificaciones, como utilizando un sonicador y controlando la temperatura de trabajo, inferior siempre a 50°C. La metacrilación de la lignina se realizó con adición de anhídrido metacrílico, que modifica los grupos hidroxilo de la lignina para quedar disponibles en la encapsulación de los compuestos bioactivos (Figs. 2 y 3).

La síntesis de oligómeros de quitosano (COS) se realizó según el procedimiento de Santos-Moriano y cols. en “Enzymatic production of fully deacetylated chitooligosaccharides and their neuroprotective and anti-inflammatory properties” [Biocatal. Biotransform. 2017, 36, 57–67; DOI: 10.1080/10242422.2017.1295231] con las modificaciones referidas por Buzón-Durán y cols. en “Antifungal agents based on chitosan oligomers, ϵ -polylysine and *Streptomyces* spp. secondary metabolites against three Botryosphaeriaceae species” [Antibiotics 2019, 8(3), 99; DOI: 10.3390/Antibiotics 8030099], como sigue:

Los oligómeros de quitosano fueron preparados a partir de quitosano de peso molecular medio 310000-375000 Da (Hangzhou Simit Chemical Technology Co. Ltd. Hangzhou, China). En el proceso, se disolvieron 20 g de quitosano en 1000 mL de agua Milli-Q añadiendo ácido cítrico con agitación constante a 60 °C y, conseguida la disolución, se añadieron 0,8 L de la endoproteasa Neutrase® (1,67 g·L⁻¹) para degradar las cadenas del polímero. La mezcla se sometió a ultrasonidos de 10 a 20 kHz durante 3 min en ciclos de 1 min con sonicación y 1 min sin sonicación para mantener la temperatura en el rango de 30–60 °C. Al final del proceso, se obtuvo una disolución con un pH en el intervalo de 4 a 6 con oligómeros de peso molecular <2000 Da.

Para la preparación de extractos de *E. arvense* y *U. dioica*, se adquirieron plantas secas certificadas por la Farmacopea Europea de “El Antiguo Herbolario” (Alicante, España). La planta completa se secó a la sombra y pulverizó en una trituradora mecánica hasta obtener un polvo fino. El polvo se secó en horno a 105 °C hasta alcanzarse un peso constante, indicador de pérdida completa de humedad. Para obtener el extracto se preparó un medio acuoso según los procedimientos de la normativa europea (SANCO/12386/2013 y SANTE/11809/2016). En el caso del extracto de *E. arvense* se

maceraron 200 g de planta seca en 10 L de agua durante 30 min y luego se hirvieron durante 45 min. Después de enfriar, la decocción se filtró y se diluyó en un factor de 10 con agua para obtener una concentración final de $2 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$. En el caso del extracto de *U. dioica*, se maceraron hojas secas (15 g/L) de 3 a 4 días a 20°C , seguido de filtrado y dilución del filtrado para obtener una concentración final de $2 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$. Finalmente, se liofilizó para obtener un polvo sólido.

Por otra parte, ejemplares de *R. tinctorum* y *S. marianum* se recogieron de la ribera del río Carrión a su paso por la localidad de Palencia (España). Las plantas completas se secaron a la sombra y se pulverizaron en una trituradora mecánica hasta obtener un polvo fino. El polvo se secó en horno a 105°C hasta alcanzarse un peso constante. Se preparó en este caso un medio hidroalcohólico mezcla de metanol:agua (1:1 v/v). Se mezcló la parte aérea seca de la planta con el medio hidrometanólico en una relación 1:20 (w/v) y calentó en un baño de agua a 50°C durante 30 min, seguidos de 5 min de sonicación. La disolución fue centrifugada a 9000 rpm durante 15 min y el sobrenadante se filtró a través de papel de filtro Whatman No. 1. Finalmente, se liofilizó para obtener un polvo sólido.

Ejemplo 2: Formación de compuesto de reticulación LM-COS-LM

Sobre una disolución acuosa de 500 mg de LM se adicionaron 250 mg de COS como agente de reticulación. La mezcla se solubilizó emulsionando por sonicación en periodos de 2 min cada uno durante un tiempo total de 20 min, manteniendo la disolución por debajo de 50°C . La emulsión resultante se agitó durante 12 horas a 40°C y se ajustó el volumen final a 50 mL. La disolución obtenida se congeló durante 24 horas a -80°C y fue sometida a liofilización para su estudio por espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (ATR-FTIR), análisis térmico y microscopía electrónica de barrido (SEM). El mismo ejemplo se repitió en medio hidrometanólico.

Ejemplo 3: Formación del complejo de inclusión con un CBA a partir del compuesto reticulado

A 50 mL de la disolución obtenida en el Ejemplo 2 se le añadieron 100 mg de un extracto natural (*R. tinctorum*, *S. marianum*, *E. arvense* y *U. dioica*). La mezcla se emulsionó por sonicación en periodos de 2 min cada uno y durante un tiempo total de 20 min, evitando que la disolución se caliente por encima de 50°C . La emulsión resultante se agitó durante 12 h a 40°C , se congeló durante 24 horas a -80°C y se liofilizó.

Ejemplo 4: Formación del complejo de inclusión con un CBA

Sobre una disolución acuosa de 500 mg de LM se adicionaron 250 mg de COS. Por separado se disolvieron 100 mg de un extracto natural (*R. tinctorum*, *S. marianum*, *E. arvense* y *U. dioica*) en 50 mL de agua y se añadieron a la disolución anterior. También se repitió la preparación de los extractos en 50 mL metanol:agua (1:1 v/v). La mezcla se emulsionó por sonicación en periodos de 2 min cada uno y durante un tiempo total de 20 min, evitando que la disolución se caliente por encima de 50 °C. La emulsión resultante se agitó durante 12 h a 40 °C. Seguidamente, se ajustó el volumen final a 50 mL obteniendo una concentración efectiva de CBA de 2 mg/mL, que corresponde aproximadamente al 10% en peso del total de nanotransportador obtenido. La disolución se congeló durante 24 horas a -80 °C y liofilizó para su estudio por espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (ATR-FTIR), análisis térmico y microscopía electrónica de barrido (SEM).

Ejemplo 5: Caracterización de los nanotransportadores

5.1.- Caracterización por espectroscopia infrarroja con transformada de Fourier (FTIR) y Reflectancia Total Atenuada (ATR)

Los espectros vibracionales infrarrojos (Figuras 4 y 5) se han registrado usando un espectrómetro FTIR Nicolet iS50 de Thermo Scientific (Waltham, MA, EEUU) equipado con un sistema integrado de reflexión total atenuada (ATR) de diamante. Los espectros se han registrado con una resolución espectral de 1 cm⁻¹ en el rango de 400–4000 cm⁻¹, tomando los interferogramas que resultaron de la coadición de 64 escaneos.

La lignina metacrilada presenta una banda débil a 1397 cm⁻¹, que se incrementa y escinde en dos bandas tras la formación del compuesto reticulado LM-COS-LM de la invención, presentando picos a 1417 y 1396 cm⁻¹. Los oligómeros de quitosano, presentan dos bandas a 1062 y 1031 cm⁻¹ que disminuyen drásticamente con la formación del compuesto LM-COS-LM, dando lugar a bandas a 1107 y 1037 cm⁻¹ que corresponden con el decrecimiento de las bandas C=C de los grupos vinilo debido a su consumo durante la reacción de reticulación Aza-Michael y la aparición de bandas -NH a 1570 cm⁻¹. En particular, el incremento de las vibraciones del enlace éster a 1652 cm⁻¹ (-C=O) y del grupo hidroxilo (-OH) a 3377 cm⁻¹ demuestran una incorporación exitosa del COS a grupos metacrílicos de la lignina (Figura 4).

Por otra parte, en los espectros correspondientes a los complejos de inclusión LM-COS cargados con *R. tinctorum*, se observa como la débil banda -NH del extracto de *R. tinctorum* a 1591 cm⁻¹ se solapa con la banda de 1570 cm⁻¹ -NH del complejo LM-COS para dar lugar a una banda muy intensa a 1571 cm⁻¹ (Figura 5).

5.2.- Caracterización por análisis térmico del compuesto reticulado LM-COS-LM y del complejo de inclusión LM-COS-R. *tinctorum*

Las curvas de TGA para el compuesto de LM-COS-LM (sin CBA), de estructura básica LM-COS-LM, muestran que se trata de un preparado de gran estabilidad. Por debajo de 200 °C sufre una pérdida de peso del 9% y sobre esa temperatura hasta 750 °C un 7% adicional. La máxima descomposición se completa a 350 °C debido a la degradación de lignina y es sensibilizada por la presencia de un exotermo (Figura 6a).

Las curvas para el complejo de inclusión LM-COS-LM cargado con extracto de *R. tinctorum* encapsulado, muestran en el calentamiento hasta 500 °C tres etapas sucesivas de descomposición con pérdidas de peso asociadas de 12%, 30% y 10%. A temperaturas superiores se observa un exotermo a 510 °C y, al final del proceso (750 °C) una pérdida de un 28% de peso añadido a los anteriores (Figura 6b).

5.3.- Caracterización por Microscopía Electrónica de Barrido (SEM)

En las Figuras 7a y 7b se muestran las micrografías por Microscopía Electrónica de Barrido (SEM) de la formación de las esferas del nanotransportador. En concreto, se presenta la formación de dendritas del nanotransportador por adición de alcohol. En las micrografías de las Figuras 8a, 8b y 8c se observa claramente la ruptura de las dendritas por la adición de agua y posterior sonicación durante 5 minutos en periodos de 1 min formando nanoesferas cargadas con el compuesto bioactivo.

Ejemplo 6: Ensayos de actividad antifúngica del complejo de inclusión con *R. tinctorum*, (b) *S. marianum*, (c) *E. arvense* y (d) *U. dioica*, frente a *N. parvum*

Se ensayó la inhibición del crecimiento micelial frente al fitopatógeno *Neofusicoccum parvum* (Pennycook & Samuels; Crous, Slippers & A.J.L. Phillips). La actividad antifúngica de los diferentes tratamientos se determinó por dilución en agar de acuerdo con los procedimientos estándar de pruebas de susceptibilidad antifúngica del EUCAST (Arendrup M.C. y cols. "W. EUCAST technical note on the EUCAST definitive document EDef 7.2: method for the determination of broth dilution minimum inhibitory concentrations of antifungal agents for yeasts EDef 7.2 (EUCAST-AFST)**"; *Clin. Microbiol. Infect.* 2012, 18, E246–E247, doi:10.1111/j.1469-0691.2012.03880.x), incorporando alícuotas de soluciones madre en el medio PDA para obtener concentraciones en el rango de 6,25-150 µg/mL. Se transfirió micelio fúngico ($\varnothing = 5$ mm) de los márgenes de *N. parvum* de una semana de edad a placas que incorporaban las concentraciones mencionadas para cada tratamiento (tres placas por tratamiento /

concentración, con dos réplicas cada una). Las placas se incubaron a continuación a 25 °C en oscuridad durante una semana. Como control se utilizó el medio PDA sin ninguna modificación. La inhibición del crecimiento micelial se estimó según la fórmula: $((d_c - d_t) / d_c) \times 100$, donde d_c y d_t representan los diámetros medios de la colonia fúngica del control y de la colonia fúngica tratada, respectivamente. Las concentraciones efectivas (CE₅₀ y CE₉₀) se estimaron utilizando el análisis PROBIT en el *software* IBM SPSS Statistics v.25 (IBM; Armonk, NY, USA).

La Figura 9 corresponde con la prueba de sensibilidad para *N. parvum*, mostrando las placas con el crecimiento radial del micelio para complejos cargados con: (a) *R. tinctorum*, (b) *S. marianum*, (c) *E. arvense* y (d) *U. dioica* obtenidos según el Ejemplo 4.

Tabla 1: concentraciones CE₅₀ y CE₉₀ de los complejos de inclusión con CBAs naturales y de los CBAs aislados, expresadas en µg·mL⁻¹.

Producto encapsulado				
Concentración efectiva (µg·mL ⁻¹)	LM-COS- <i>R. tinctorum</i>	LM-COS- <i>S. marianum</i>	LM-COS- <i>E. arvense</i>	LM-COS- <i>U. dioica</i>
CE ₅₀	41,2	60,9	66,5	50,2
CE ₉₀	65,8	90,6	105,2	113,0
Producto sin encapsular				
Concentración efectiva (µg·mL ⁻¹)	<i>R. tinctorum</i>	<i>S. marianum</i>	<i>E. arvense</i>	<i>U. dioica</i>
CE ₅₀	92,3	557	----	----
CE ₉₀	184,0	2938	----	----

Cabe destacar los resultados obtenidos para el complejo cargado con el extracto de *R. tinctorum*, cuyas CE₅₀ y CE₉₀ fueron 41,2 y 65,8 µg/mL - inferiores a los obtenidos con los otros compuestos bioactivos. Todos los complejos mostraron una eficacia mejorada frente a los extractos sin encapsular. Para *E. arvense* y *U. dioica*, no hubo inhibición del crecimiento micelial a la mayor concentración ensayada, de 150 µg/mL.

Por último, en la Figura 10 se muestra el diámetro del crecimiento del micelio. Como puede observarse, se logra la inhibición del crecimiento micelial a unas concentraciones de 75 y 100 µg·mL⁻¹ en los complejos cargados con los extractos de *R. tinctorum* y *S. marianum*, respectivamente. Estos valores fueron ligeramente superiores en el caso de *E. arvense* y *U. dioica*.

Ejemplo 7: Actividad antifúngica del complejo de inclusión con *R. tinctorum* frente al hongo *D. seriata*

Se realizó un ensayo complementario de inhibición del crecimiento micelial frente al fitopatógeno *Diplodia seriata* De Not., siguiendo el mismo procedimiento experimental que en el Ejemplo 6.

En la Figura 11 se muestra el diámetro del crecimiento del micelio. Como puede observarse, el complejo LM-COS-*R. tinctorum* logra la inhibición completa del crecimiento micelial del fitopatógeno *D. seriata* a la concentración de 100 µg·mL⁻¹, con valores de CE₅₀ y CE₉₀ de 59,3 y 91,0 µg/mL, respectivamente.

Ejemplo 8: Actividad antifúngica del compuesto reticulado respecto al hongo *N. parvum*

Se realizaron ensayos únicamente con el compuesto LM-COS-LM obtenido en el Ejemplo 2, en ausencia de CBA, para dilucidar la acción de los oligómeros de quitosano en el elevador poder antifúngico observado para el hongo *N. parvum*. El método experimental que se llevó a cabo fue el mismo que en los ejemplos anteriores. La Figura 12 muestra los resultados obtenidos. Como era de esperar su actividad antimicrobiana es más débil, presentando una actividad fungistática, pero no fungicida como sí se ha observado para el complejo de inclusión cargado con CBA. Las CE₅₀ y CE₉₀ resultaron de 82,7 y 243,2 µg/mL, y sugieren la necesidad de emplear un CBA para cargar al compuesto reticulado a fin de que resulte eficaz frente a los fitopatógenos.

Ejemplo 9: Actividad antibacteriana del complejo de inclusión con *R. tinctorum* frente *Pseudomonas syringae* y *Xylophilus ampelinus*

Con el objetivo de establecer el amplio espectro de los nanotransportadores LM-COS-CBA se realizaron ensayos de actividad antibacteriana contra *P. syringae* y *X. ampelinus*, dos bacterias fitopatógenas que degradan lignina. Estos ensayos se realizaron con el complejo LM-COS-*R. tinctorum* obtenido según el Ejemplo 4 por ser el que mejor resultados ha obtenido frente a hongos fitopatógenos.

La actividad antibacteriana se evaluó por determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI). Se utilizó el método de dilución en agar, según la norma M07-11 del CLSI (CLSI. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. 11th Ed. CLSI standard M07.; Clinical and Laboratory Standards Institute: Wayne, PA, USA, 2018). Una colonia aislada de *P. syringae* o *X. ampelinus* se incubó

en medio líquido TSB a 26 °C durante 18 h. Partiendo de una concentración de 10^8 UFC·mL⁻¹, se realizaron diluciones en serie para obtener un inóculo final de $\sim 10^4$ UFC·mL⁻¹. Posteriormente, las suspensiones bacterianas se suministraron a la superficie de las placas de TSA enmendadas con los tratamientos en concentraciones que iban de 6,25 a 150 µg/mL. Las placas se incubaron a 26 °C durante 24 h. Las CMI se determinaron visualmente como las concentraciones más bajas a las que no se observó crecimiento bacteriano en las diluciones de agar. Todos los experimentos se realizaron por triplicado, y cada réplica consistió en tres placas por tratamiento / concentración.

La inhibición de LM-COS-*R. tinctorum* fue similar con *P. syringae* y *X. ampelinus*, con valores de CMI de 37,5 µg·mL⁻¹ (Tabla 2). Se puede afirmar que el complejo LM-COS-*R. tinctorum* es incluso ligeramente más efectivo frente a bacterias que hongos.

Tabla 2. Inhibición del complejo LM-COS-*R. tinctorum*

Patógeno	Tratamiento	6.25	9.75	12.5	18.75	25	37.5	50	75	100	150
<i>P. syringae</i>	LM-COS- <i>R.</i>	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
<i>X. ampelinus</i>	<i>tinctorum</i>	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-

Ejemplo 10: comparación de resultados respecto del nanotransportador de lignina-diamina-lignina descrito en WO2017134308

WO2017134308 describe un nanotransportador de lignina-diamina-lignina sintetizado con aminas terciarias como agentes de reticulación y cargado con el fungicida químico piraclostrobina, ampliamente utilizado en la agricultura. La piraclostrobina tiene un tamaño mucho menor que un compuesto bioactivo natural, de forma que no es posible la comparación directa de resultados con los nanotransportadores LM-COS-CBAs de la presente invención. En este ejemplo se ha replicado la síntesis de los nanotransportadores de WO2017134308 pero cargados con CBAs. El ensayo se realizó frente a *N. parvum* siguiendo el mismo procedimiento que en el Ejemplo 6.

Tabla 3. Comparación de las concentraciones efectivas CE₅₀ y CE₉₀ de los nanotransportadores LM-COS-CBA de la presente invención y los de WO2017134308.

		LM-diamina-CBA	LM-COS-CBA	% mejora
<i>R. tinctorum</i>	CE ₅₀	53,2	41,2	22,6%
	CE ₉₀	92,2	65,8	28,6%
<i>S. marianum</i>	CE ₅₀	82,9	60,9	26,5%

	CE₉₀	167,5	90,6	45,9%
<i>E. arvense</i>	CE₅₀	134,2	66,5	50,4%
	CE₉₀	431,3	105,2	75,6%
<i>U. dioica</i>	CE₅₀	67,6	50,2	25,7%
	CE₉₀	129,0	113,0	12,4%

Se observa que los nanotransportadores de la presente invención presentan una mejora en su actividad de dos dígitos porcentuales para todos los compuestos bioactivos respecto de los descritos en WO2017134308.

5

Ejemplo 11. Aplicación *in planta* del nanotransportador LM-COS-*R. tinctorum*

Se realizaron ensayos *in planta* por inyección (vía endoterapia) del nanotransportador más efectivo, LM-COS-*R. tinctorum*, en 20 vides (variedad *Cabernet sauvignon* sobre portainjerto SO4) plantadas en el año 2000 en la finca “Clau” de la bodega Viñas del Vero (D.O. Somontano, Barbastro, Huesca). Todas estas vides presentaban síntomas

10

El complejo se inyectó en uno de los brazos de cada vid, utilizando el otro brazo como control. El sitio del brazo seleccionado para la inyección se roció con hipoclorito sódico al 5% para esterilizar la superficie de la madera. Posteriormente, se taladró un orificio de 20 mm de profundidad, en el que se instaló un tapón de micelio con válvula antirretorno. La broca se esterilizó con etanol antes de perforar la siguiente planta. A continuación, el sistema de inyección se cargó con 5 mL del complejo LM-COS-*R. tinctorum* obtenido según el Ejemplo 4. No fue necesario sellar la herida con cera para evitar contaminaciones por la tipología del tapón de micelio empleado en el sistema de endoterapia seleccionado. La segunda inyección del tratamiento se realizó un mes más tarde empleando en mismo punto de inyección. El seguimiento de las plantas se realizó durante 5 meses.

15

20

Los resultados obtenidos en este ensayo en campo permiten concluir que no existen diferencias estadísticamente significativas entre los brazos tratados con el nanotransportador LM-COS-*R. tinctorum* y los brazos no tratados (control) en términos de número de racimos, calidad de producción (graduación alcohólica) y función fotosintética, descartándose así efectos fitotóxicos del tratamiento. Sí se detectó una clara reducción de los síntomas foliares asociados a las enfermedades de la madera de la vid y un incremento significativo en la producción en los brazos tratados frente a los brazos control (3177 g/brazo frente a 1932 g/brazo), sugestivos de una alta efectividad.

30

REIVINDICACIONES

1. Compuesto reticulado, caracterizado por que comprende lignina metacrilada (LM) y oligómeros de quitosano (COS), en que dichos oligómeros de quitosano tienen un peso molecular medio <2000 Da.
2. Un compuesto reticulado según la reivindicación 1, caracterizado por que dichos oligómeros de quitosano tienen un peso molecular de entre 1500-3000 Da.
3. Un compuesto reticulado según la reivindicación 1 ó 2, caracterizado por que comprende una relación molar LM:COS de 2:1.
4. Nanotransportador caracterizado por que comprende el compuesto reticulado de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, y al menos un compuesto bioactivo (CBA) que interacciona con dicho compuesto reticulado por enlaces iónicos o de hidrógeno.
5. Un nanotransportador según la reivindicación 4, caracterizado por que dicho CBA es sintético.
6. Un nanotransportador según la reivindicación 4, caracterizado por que dicho CBA es natural.
7. Un nanotransportador según la reivindicación 6, caracterizado por que dicho CBA natural se selecciona del grupo que consiste en un polifenol, un terpeno, un aceite terpénico, un ácido fenilpropanóico, un fitoestrógeno, un carotenoide, un ácido grado, un aceite, un lignano, un cumestato, un prebiótico, una vitamina y una xantofila, o una combinación de ellos.
8. Un nanotransportador según la reivindicación 7, caracterizado por que dicho CBA es un polifenol o mezcla de polifenoles.
9. Un nanotransportador según cualquiera de las reivindicaciones 4 a 8, caracterizado por que presenta una relación molar LM:COS:CBA de 2:1:1.
10. Un nanotransportador según cualquiera de las reivindicaciones 4 a 9, caracterizado por que está en forma de polvo.
11. Un procedimiento de obtención del nanotransportador de cualquiera de las reivindicaciones 4 a 10, caracterizado por que comprende:
 - a. preparación de una disolución que comprende lignina metacrilada (LM), oligómeros de quitosano (COS) de peso molecular medio <2000 Da y al menos un compuesto bioactivo (CBA);
 - b. sonicación para obtener dicho complejo de inclusión (LM-COS-CBA); y
 - c. purificación del complejo de inclusión obtenido en la etapa anterior.
12. Un procedimiento según la reivindicación 11, caracterizado por que comprende una relación molar LM:COS en la disolución de la etapa a) de 3:1 a 2:1.

13. Un procedimiento según la reivindicación 11, caracterizado por que comprende una relación molar LM: COS: CBA en la etapa a) de 3:1:0,5.
14. Uso del nanotransportador de cualquiera de las reivindicaciones 4 a 10, en el tratamiento de una enfermedad causada por un fitopatógeno en una planta.
- 5 15. Uso según la reivindicación 14, caracterizado por que dicha enfermedad es una enfermedad de la madera.
16. Uso según la reivindicación 14, caracterizado por que dicha enfermedad es una enfermedad fúngica.
- 10 17. Uso según la reivindicación 16, caracterizado por que dicha enfermedad fúngica es el mal del plomo o enfermedad de la hoja plateada, verticilosis, botriosfera, septoria o antracnosis.
18. Uso según la reivindicación 14, caracterizado por que dicha enfermedad es una enfermedad bacteriana.
- 15 19. Uso según la reivindicación 18, caracterizado por que dicha enfermedad bacteriana es bacteriosis, chancros, necrosis o marchitez bacteriana de frutales con hueso.
20. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 14 a 19, caracterizado por que dicha planta es vid.
- 20 21. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 14 a 20, caracterizado por que dicho nanotransportador se administra en la planta por endoterapia.
22. Uso del compuesto reticulado según las reivindicaciones 1 a 3, en la extracción de metales pesados en agua.

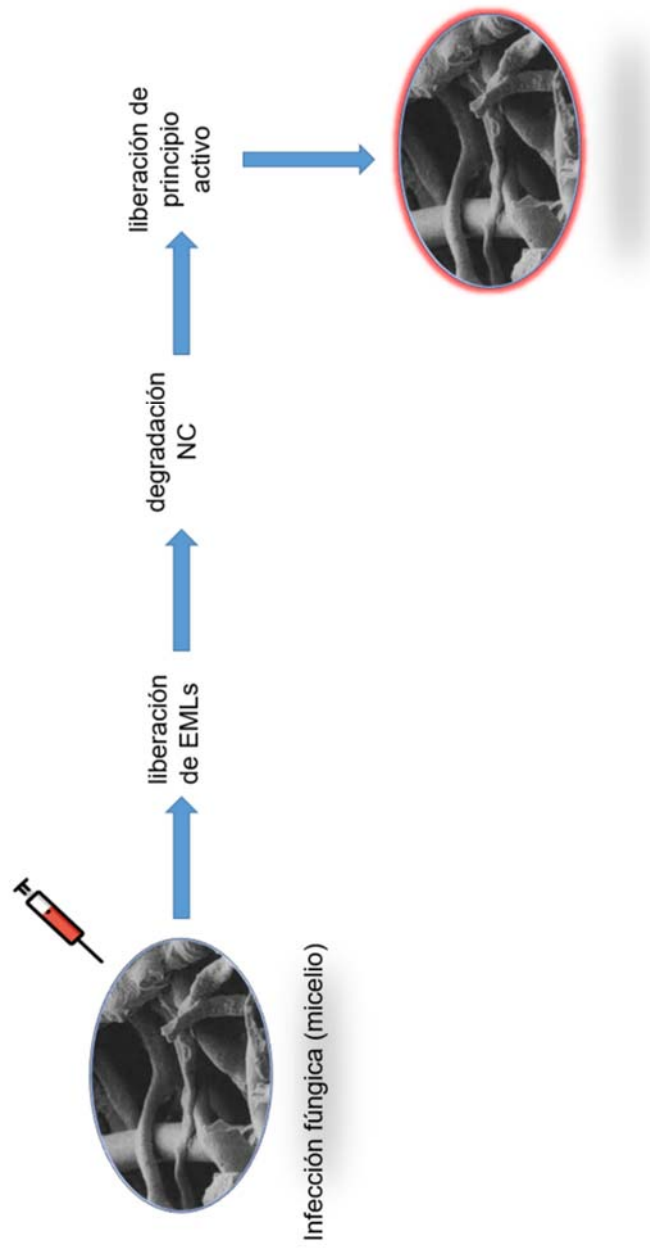


Fig. 1

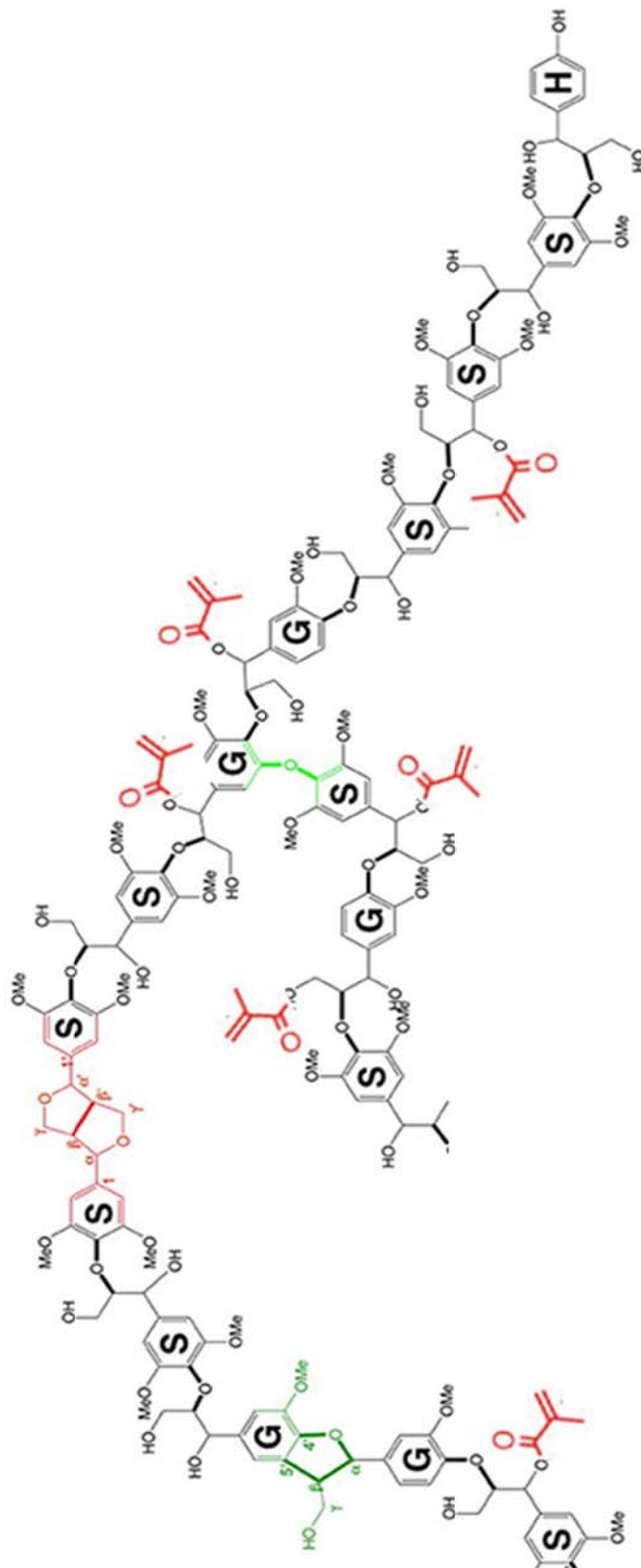


Fig. 2

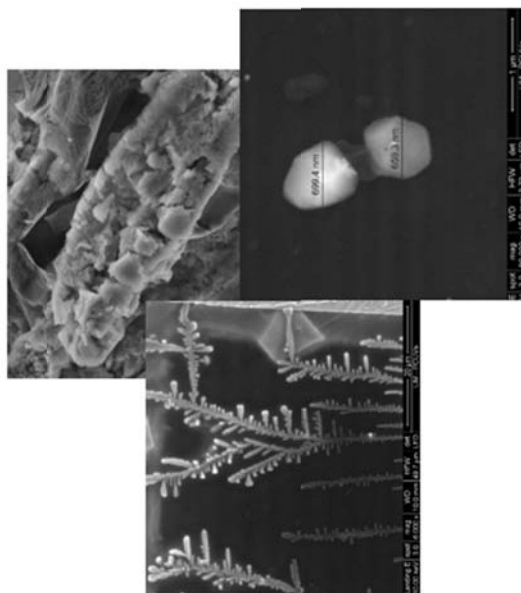
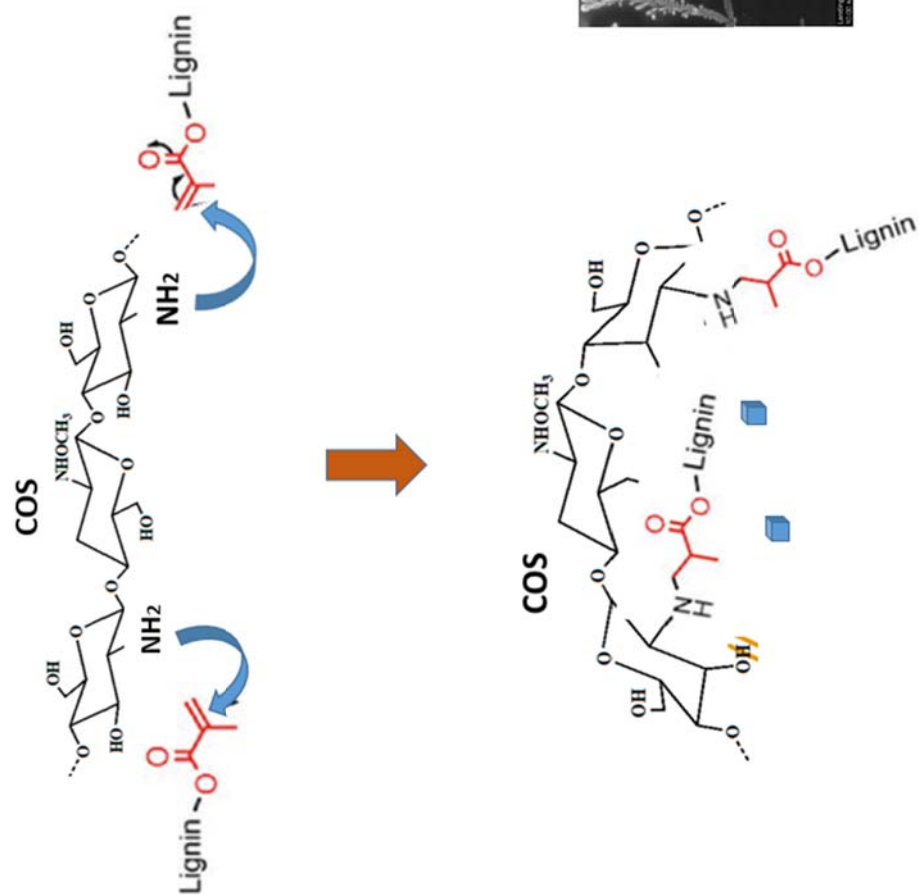


Fig. 3

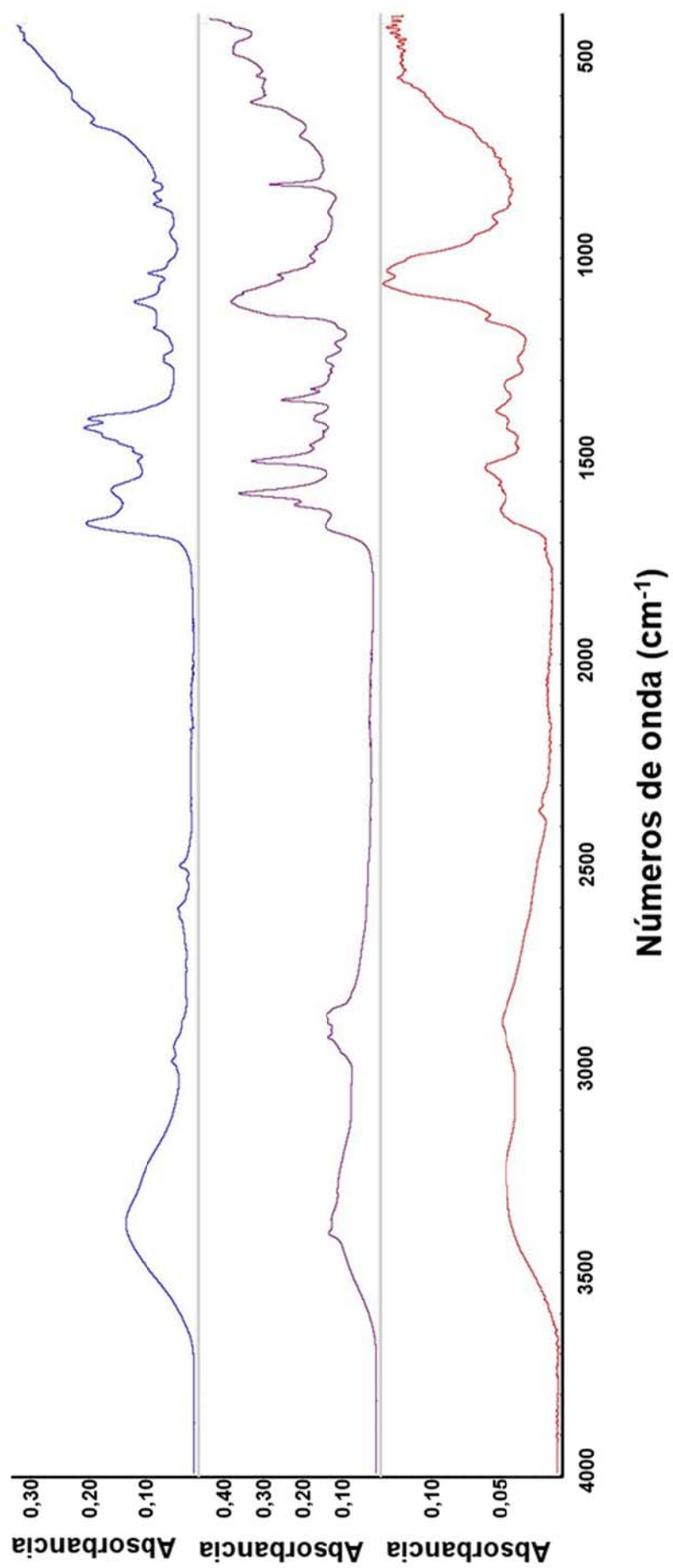


Fig. 4

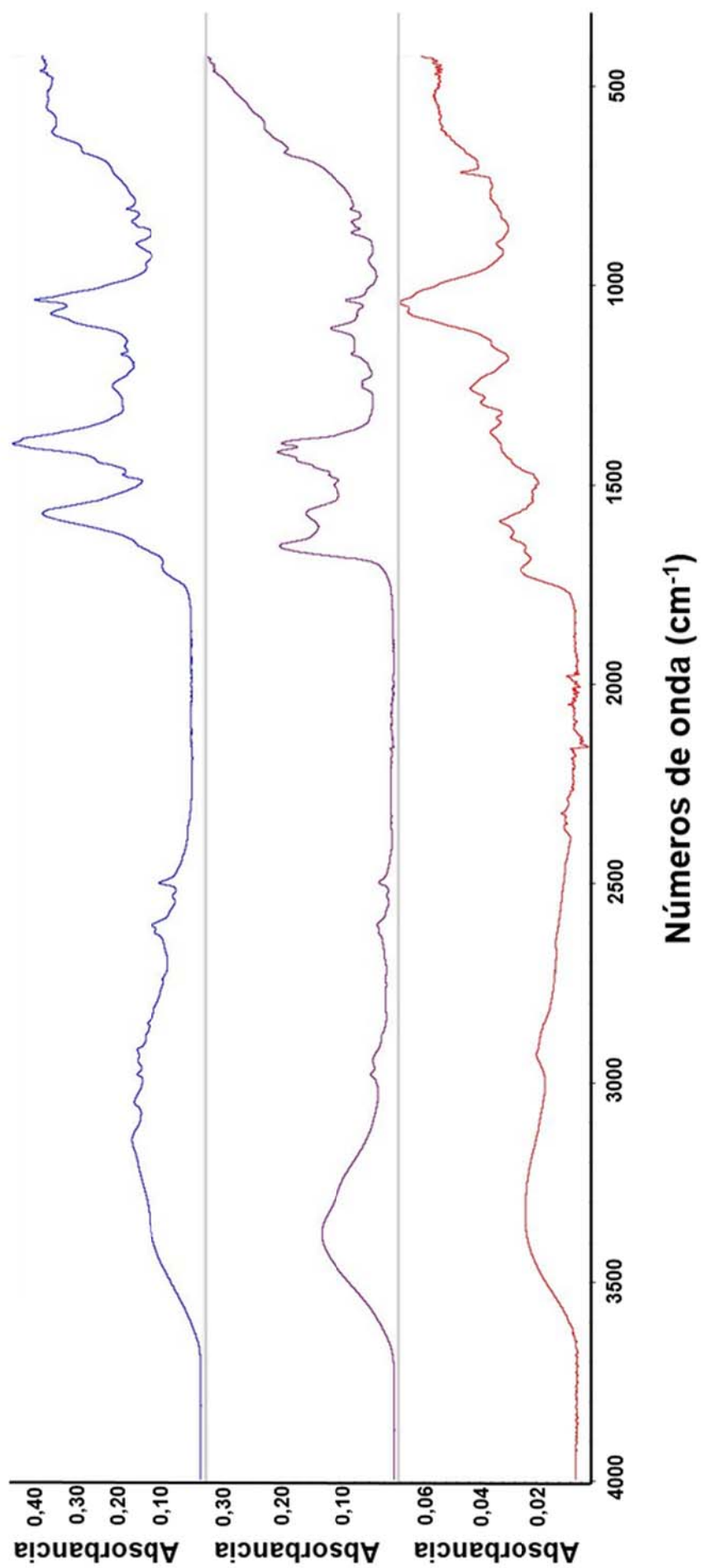


Fig. 5

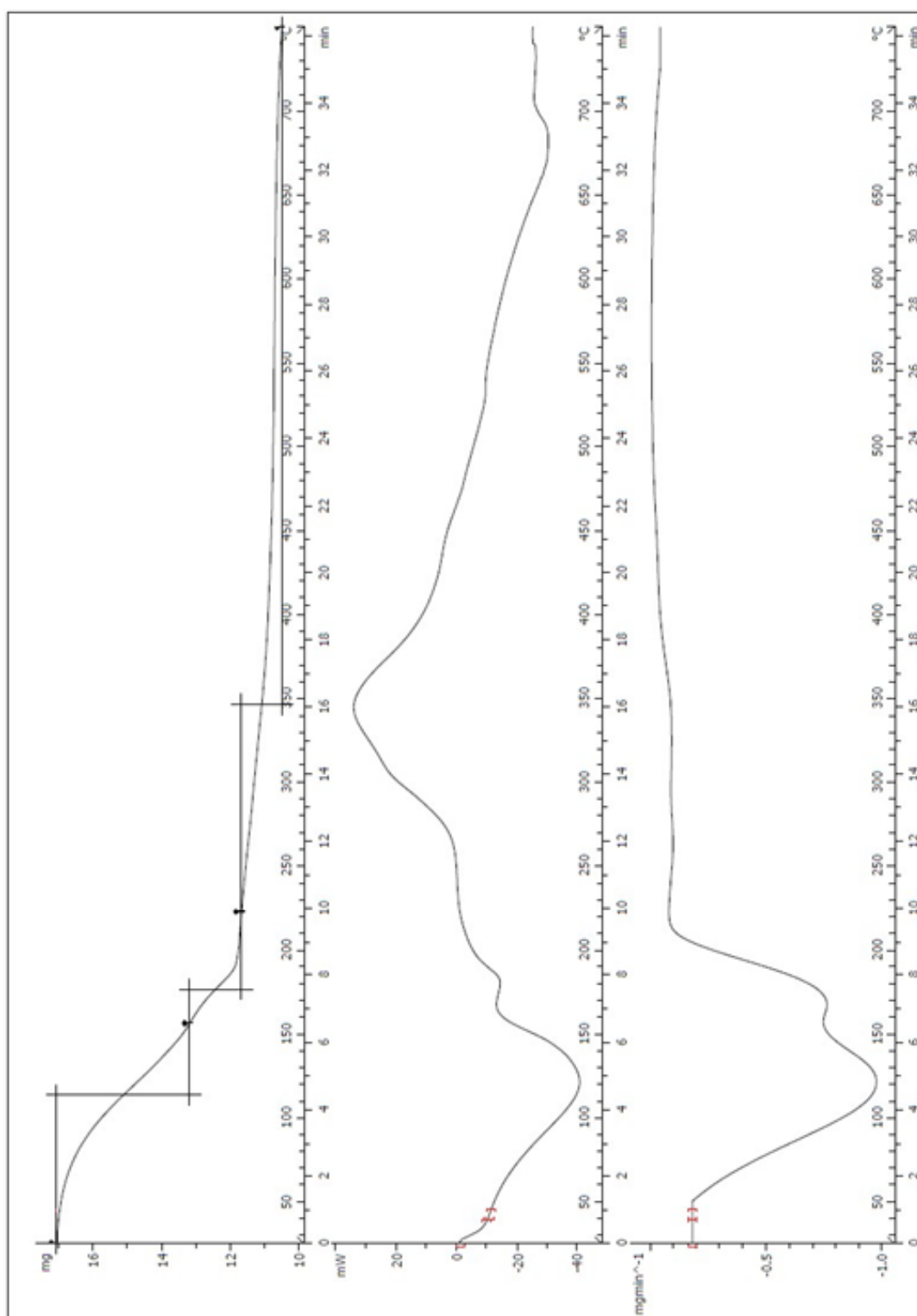


Fig. 6a

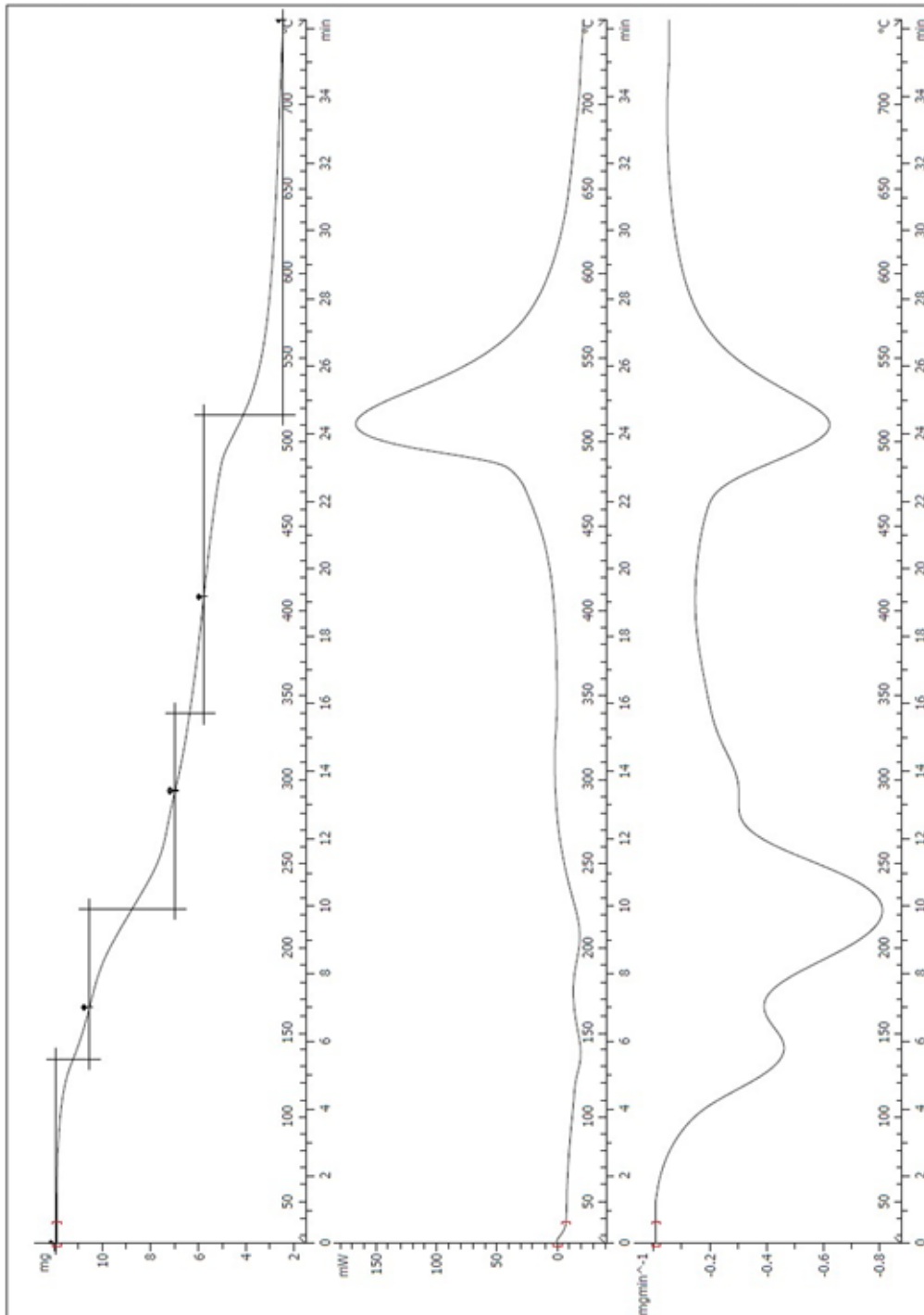


Fig. 6b

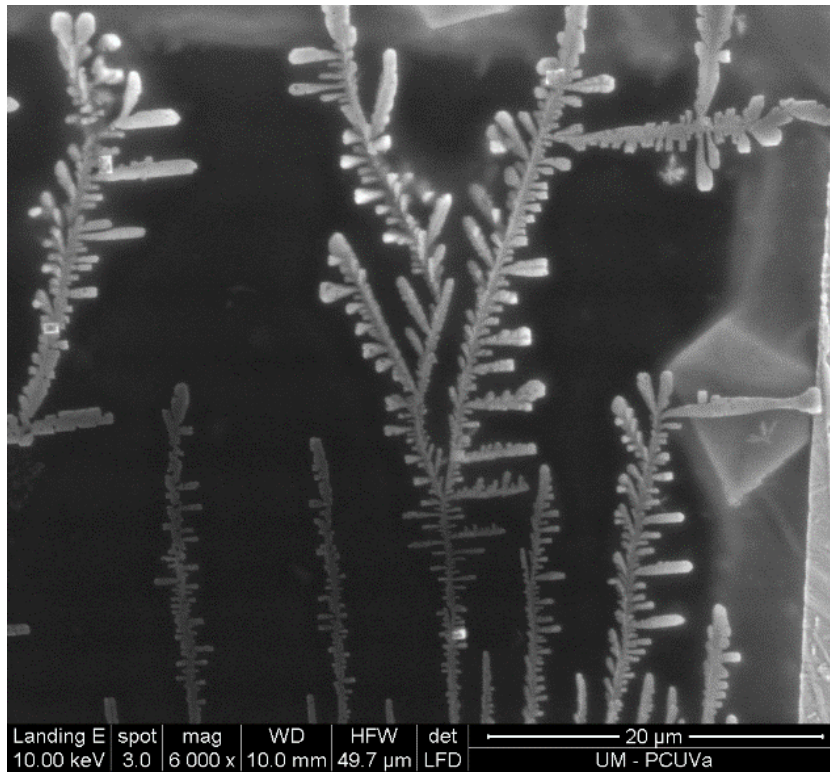


Fig. 7a

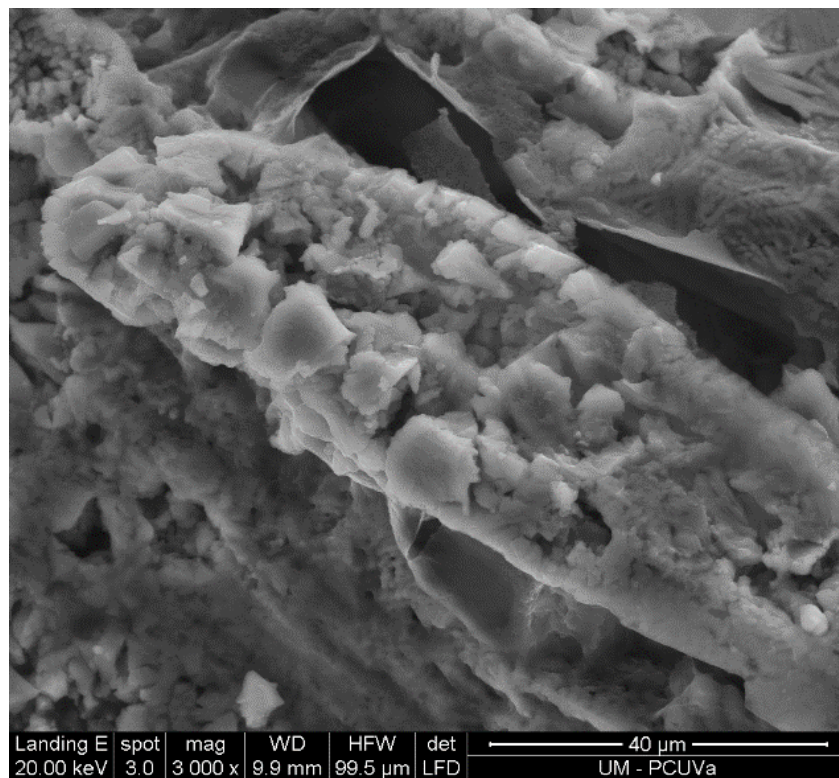


Fig. 7b

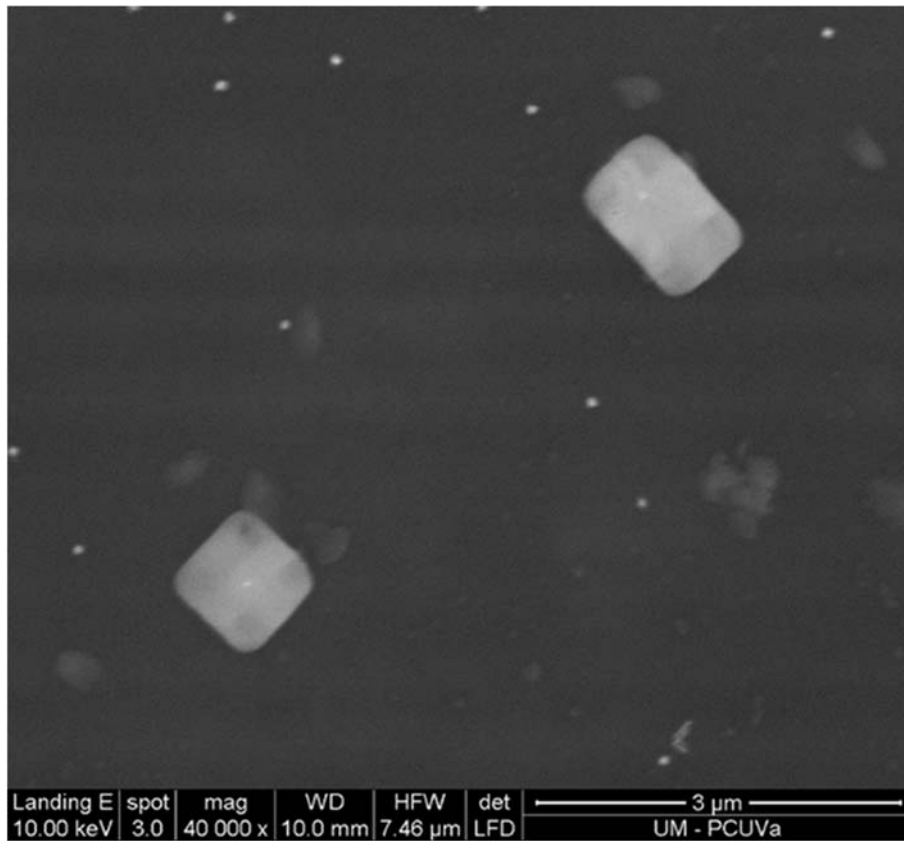


Fig. 8a

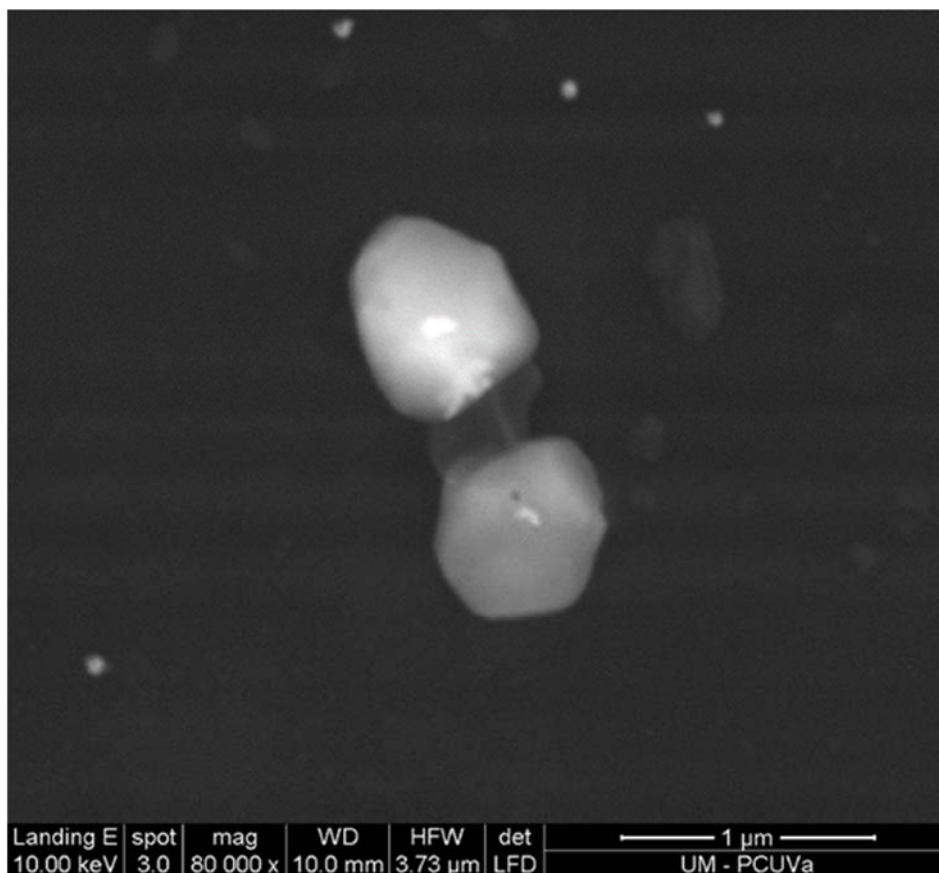


Fig. 8b

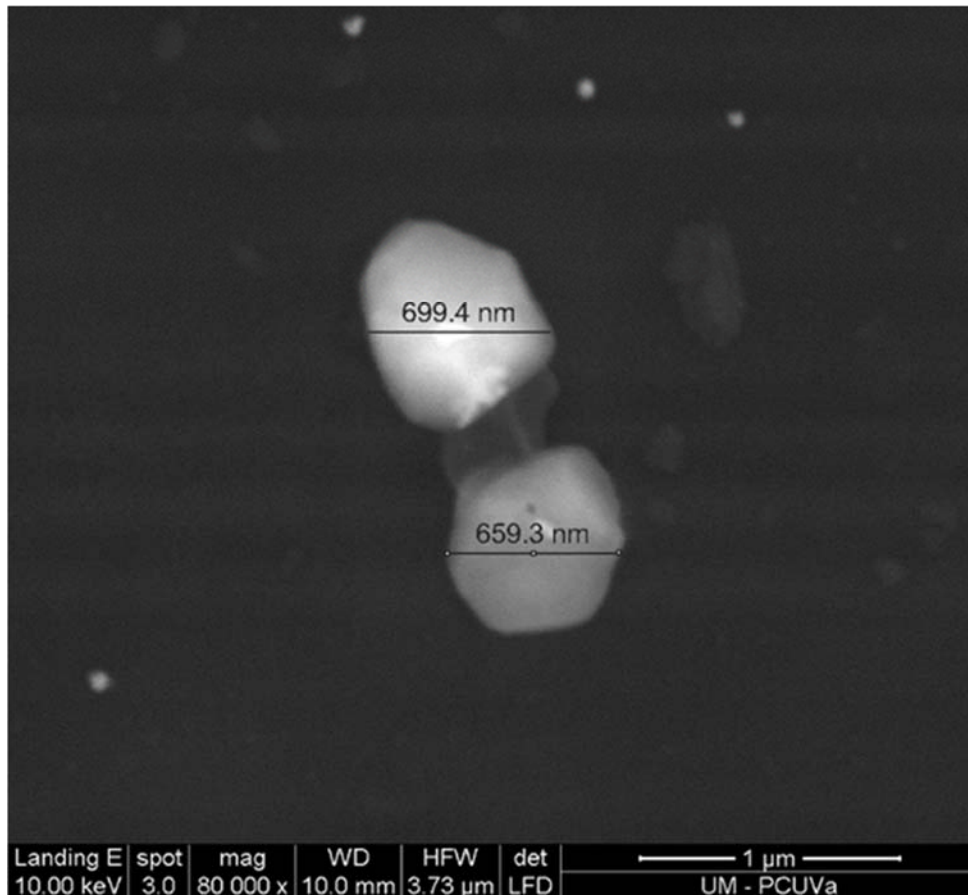


Fig. 8c

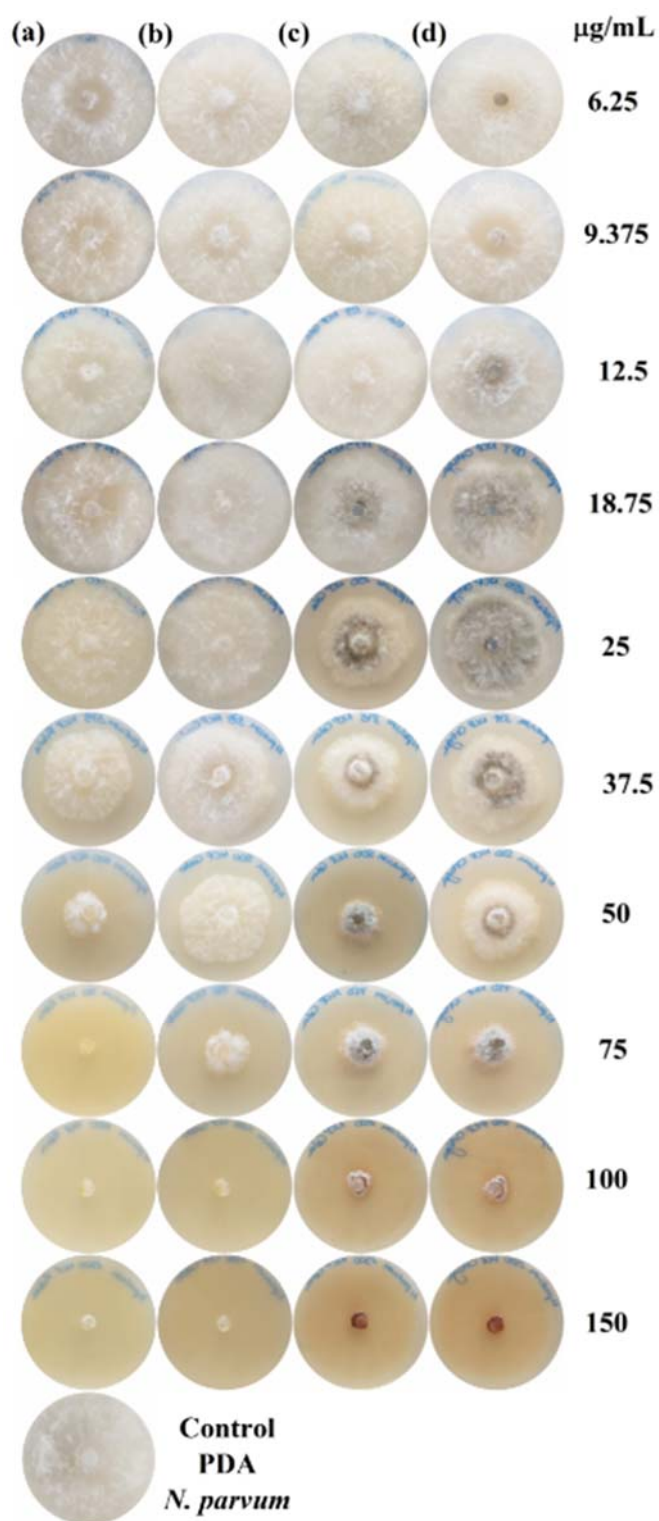


Fig. 9

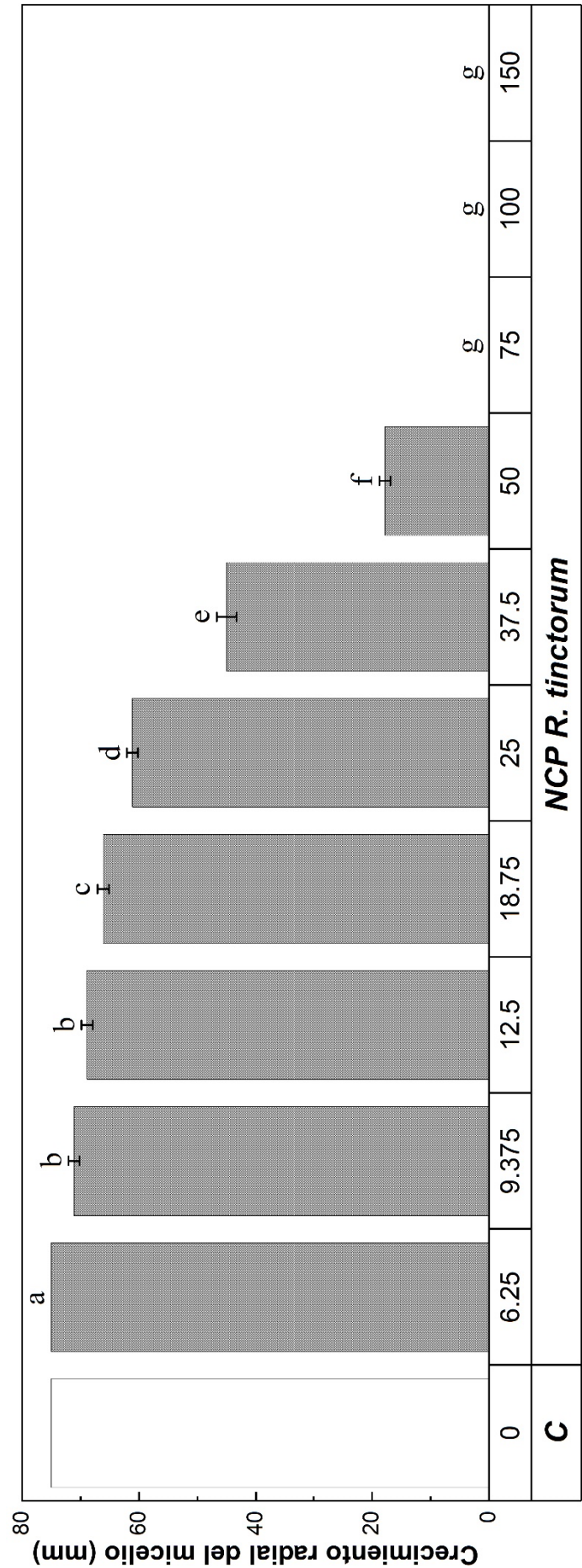


Fig. 10a

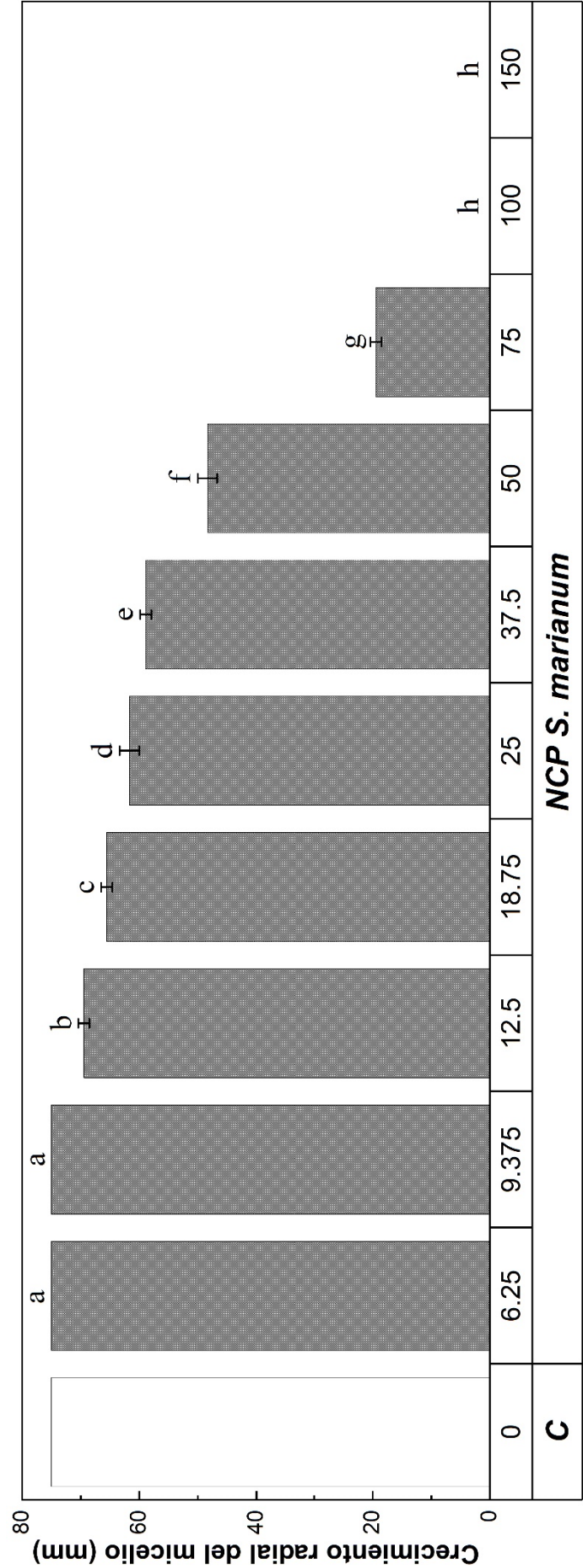


Fig. 10b

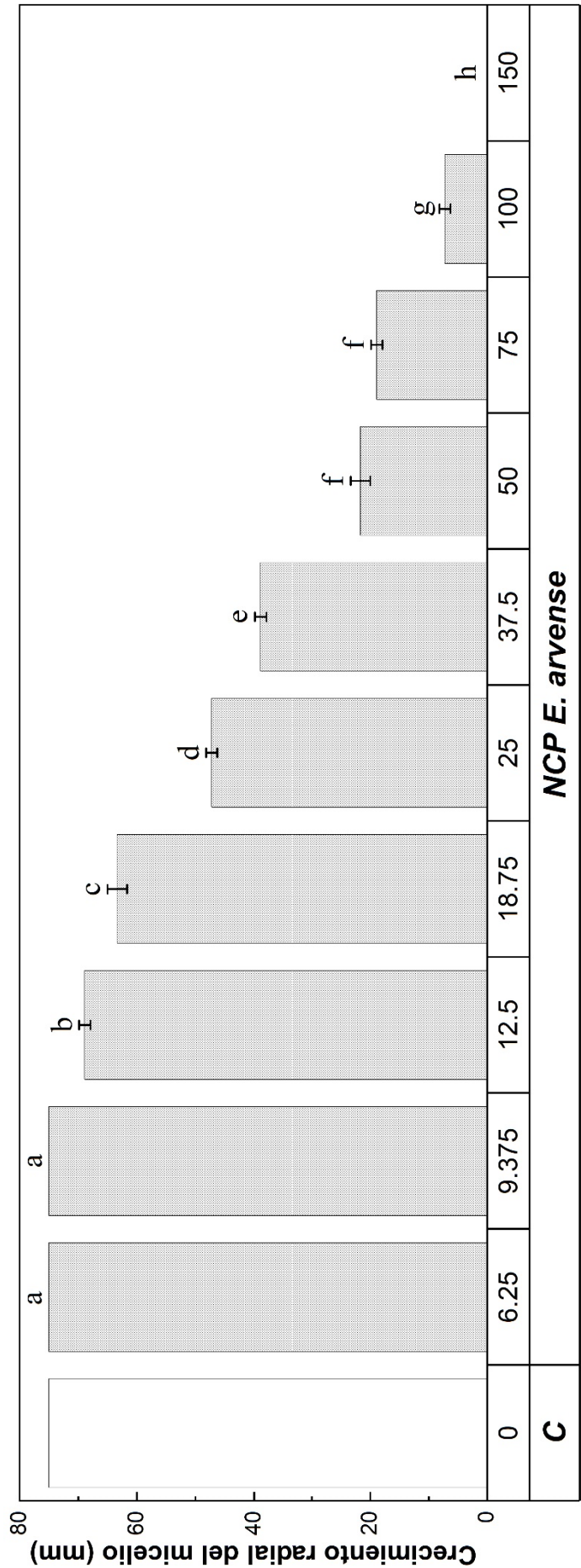


Fig. 10c

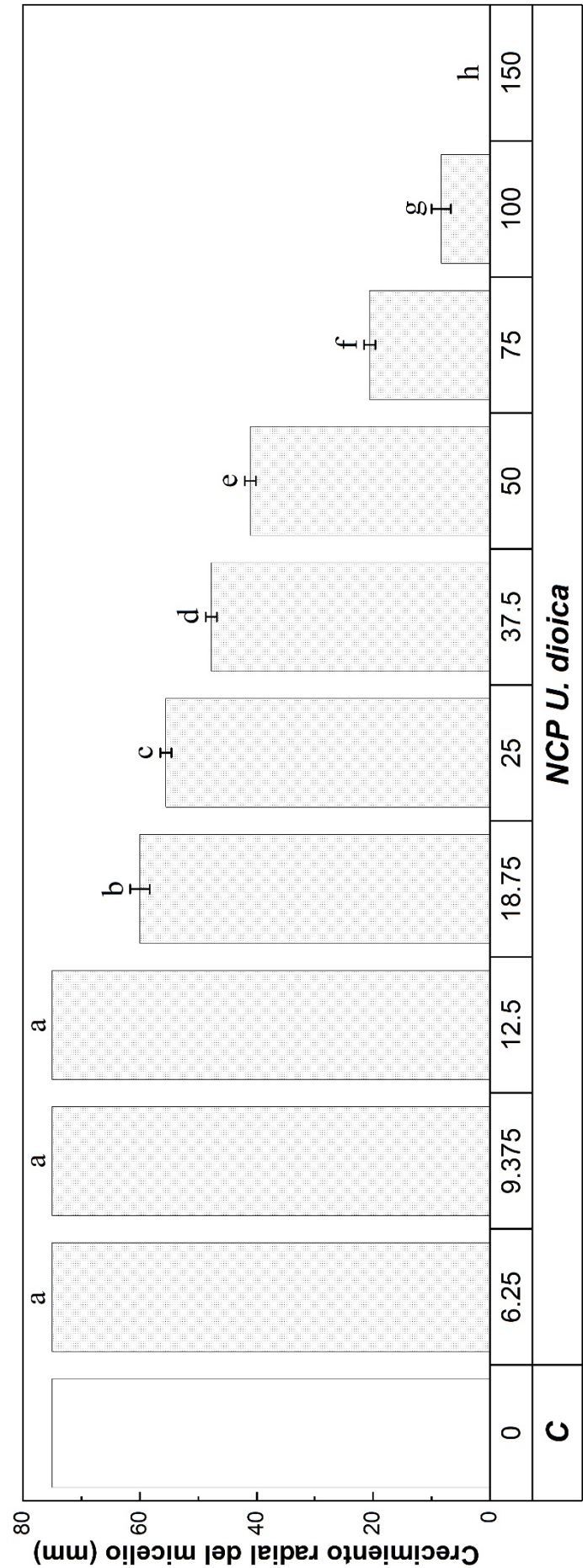


Fig. 10d

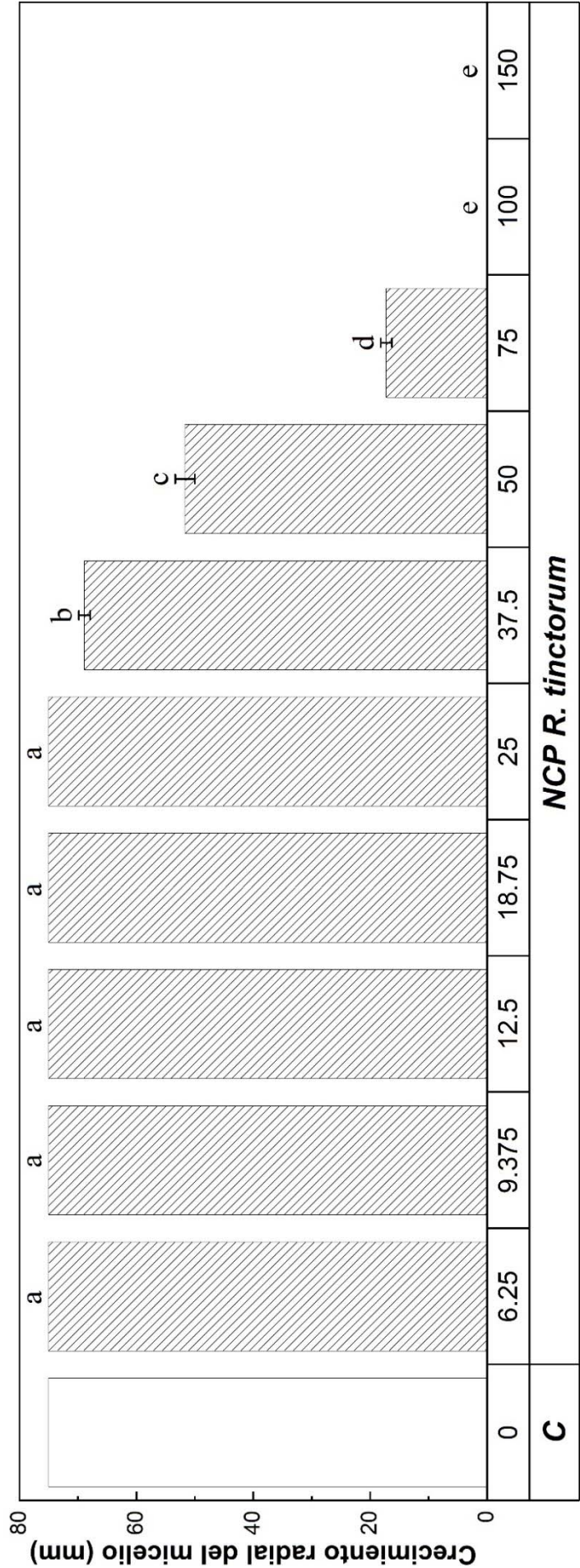


Fig. 11

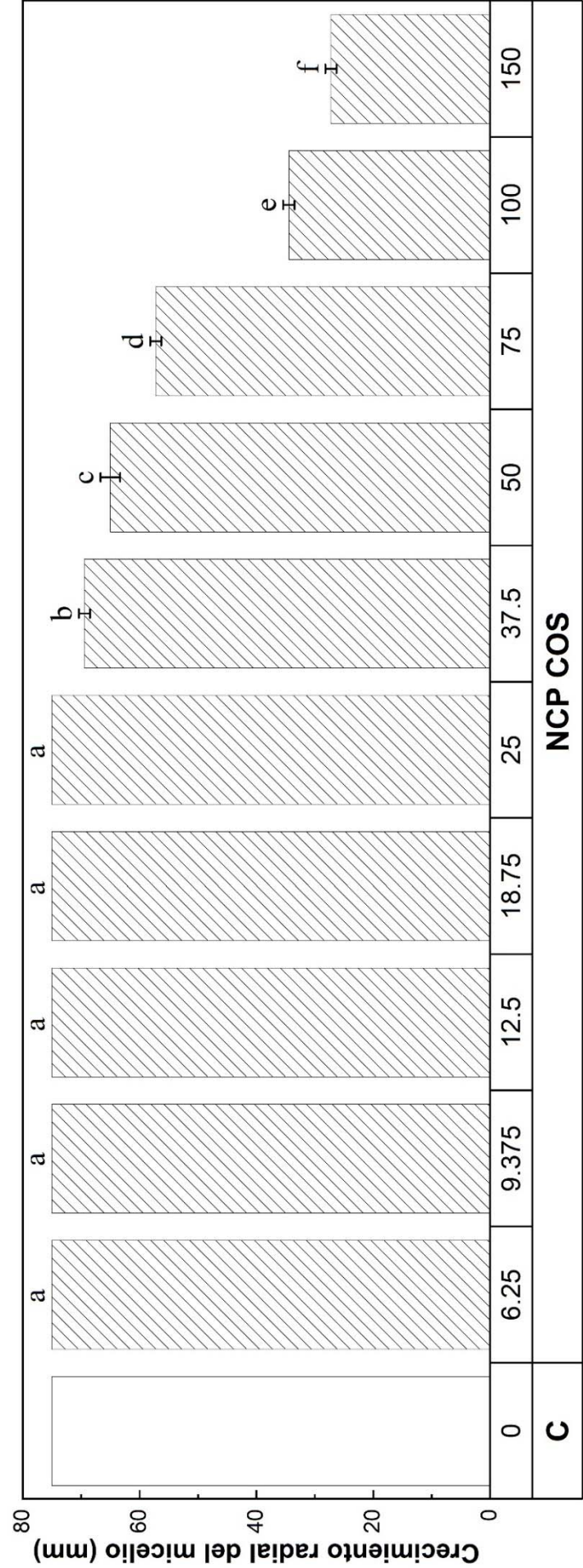


Fig. 12



- ②① N.º solicitud: 202131019
②② Fecha de presentación de la solicitud: 29.10.2021
③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤① Int. cl.: Ver Hoja Adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
D, A	WO 2017134308 A1 (MAX-PLANCK-GESELLSCHAFT ZUR FÖRDERUNG DER WSS EV et al.) 10/08/2017. Página 3 línea 24-página 4 línea 21, pág. 7 lín. 25-pág. 8 lín. 3, págs. 13-15, pág. 18 lín. 5-15, pág. 19 lín. 5-pág. 21 lín. 20 y Figura 5.	1-22
A	MACHADO, T. O. et al. Bio-Based Lignin Nanocarriers Loaded with Fungicides as a Versatile Platform for Drug Delivery in Plants. Biomacromolecules, 16/06/2020, Vol. 21, Páginas 2755-2763, <DOI: 10.1021/acs.biomac.0c00487>. Resumen, sección experimental, página 2758 columna 2, pág. 2759 col. 1, Esquema 2 y Tabla 2.	1-22
A	FISCHER, J. et al. Targeted Drug Delivery in Plants: Enzyme-Responsive Lignin Nanocarriers for the Curative Treatment of the Worldwide Grapevine Trunk Disease Esca. Advanced Science, 29/05/2019, Vol. 6, N° 1802315, <DOI: 10.1002/advs.201802315>. Resumen, sección resultados y discusión, página 3 columna 1, Esquema 1 y Figura 1, 3 y S7.	1-22
A	HAN, S. et al. Cu(II) Ion Adsorption onto Hydroxymethylated Lignin-Chitosan Crosslinked Membrane. BioResources, 08/07/2014, Vol. 9, N° 3, Páginas 4971-4980, <DOI: 10.15376/biores.9.3.4971-4980>. Resumen, páginas 4972, 4973 y 4975.	1-3, 22
A	WO 2020149755 A2 (QATAR FOUND EDUCATION SCIENCE & COMMUNITY DEV) 23/07/2020. Párrafos 0009, 0010, 0014, 0017, 0035, 00108, 00239, 00336 y Figura 17.	1-3

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

D: citados por el solicitante en la descripción de la solicitud
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
19.09.2022

Examinador
B. de Luis Fernández

Página
1/3



- ②① N.º solicitud: 202131019
②② Fecha de presentación de la solicitud: 29.10.2021
③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤① Int. Cl.: Ver Hoja Adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	WO 2020149755 A2 (QATAR FOUND EDUCATION SCIENCE & COMMUNITY DEV) 23/07/2020. Párrafos 0012, 0015, 0020, 0021, 0055, 0060, 0064, 0101, 0102, Figura 3, 4 y 15.	1-3
A	BEER, B. et al. Controlled enzymatic hydrolysis and synthesis of lignin cross-linked chitosan functional hydrogels. International Journal of Biological Macromolecules, 08/08/2020, Vol. 161, Páginas 1440-1446, <DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2020.08.030>. Resumen, sección 3.2 y página 1441 columna 1.	1-3
A	HASKE-CORNELIUS, O. et al. Enzymatic synthesis of highly flexible lignin cross-linked succinyl-chitosan hydrogels reinforced with reed cellulose fibres. European Polymer Journal, 20/08/2019, Vol. 120, Nº 109201, <DOI: 10.1016/j.eurpolymj.2019.08.028>. Resumen, sección 4 y Figura 4.	1-3
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 D: citados por el solicitante en la descripción de la solicitud 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 19.09.2022	Examinador B. de Luis Fernández	Página 2/3

CLASIFICACIÓN OBJETO DE LA SOLICITUD

A01N25/28 (2006.01)

A01N65/00 (2009.01)

C08L5/08 (2006.01)

C08L97/00 (2006.01)

A01P1/00 (2006.01)

A01P3/00 (2006.01)

C02F1/28 (2006.01)

C02F1/62 (2006.01)

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

A01N, C08L, A01P, C02F

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, NPL, CAPLUS, XPESP